NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS SCHWEINENIERENCORTEX UND -MEDULLA

ISOLIERUNG UND KINETISCHE CHARAKTERISIERUNG DER BEIDEN ENZYME

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Jürgen Schärfe

aus Hamburg

1981

NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS SCHWEINENIERENCORTEX UND -MEDULLA

ISOLIERUNG UND KINETISCHE CHARAKTERISIERUNG DER BEIDEN ENZYME

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Jürgen Schärfe

aus Hamburg

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 11. 1981

Dekan : Prof. Dr. E. Reinhard

1. Berichterstatter : Prof. Dr. D. Mecke

2. Berichterstatter : Prof. Dr. U. Weser

Abstract

Schärfe, Jürgen:
NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS SCHWEINENIERENCORTEX UND -MEDULLA. ISOLIERUNG UND KINETISCHE CHARAKTERISIERUNG DER BEIDEN ENZYME.

NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.141) aus Schweinenierencortex bzw. -medulla wurde unter Ausnutzung verschiedener ihrer molekularen Eigenschaften (Ladung, Hydrophobizität, Nucleotidbindung, Molekulargewicht, NAD-Bindung) über eine automatisierbare Chromatographiekette isoliert. Bezogen auf den 140 000 x g - Überstand des jeweiligen Homogenats wurden die Enzyme ca. 590 000-fach bzw. ca. 490 000-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 710 000 bzw. 121 000 mU/mg Protein angereichert (Ausbeute: 16 bzw. 10 %). Analytische Polyacrylamid-Disk-Elektrophoresen zeigten jeweils nur eine scharfe Aktivitätsbande und keine Proteinbande. Durch Gelfiltration an Sephadex G-100 wurde für beide Enzyme ein scheinbares Molekulargewicht von 51 000 ermittelt. Cortex und Medulla hatten ein Aktivitätsverhältnis von ca. 8 : 1. Die Enzymkonzentration ist in beiden Kompartimenten ca. 10^{-10} M. Die Trennung beider Enzyme gelang über ihre stark unterschiedliche Hydrophobizität.

Über Nucleotid/Prostaglandin-Kreuzserien und Hemmkinetiken wurden die kinetischen Konstanten der Prostaglandine der E-, F-, A-, B- und D-Reihe und vieler derer Metabolite bestimmt. Die NAD/Prostaglandin-Kreuzserien und Produktinhibitionsmuster für Hin- und Rückreaktion zeigen, daß beide Enzyme entsprechend einem Ordered Bi Bi-Mechanismus mit NAD als führendem Substrat reagieren. Dieses kinetische Verhalten wurde für die Affinitätschromatographie an NAD-Agarose-Gelen ausgenutzt. Unter dem Einfluß hoher Glycerinkonzentrationen zeigen beide Enzyme ein von einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik abweichendes kinetisches Verhalten.

Abgesehen von der stärkeren Hydrophobizität des Cortexenzyms zeigen beide Enzyme bezüglich ihres molekularen und kinetischen Verhaltens keine signifikanten Unterschiede.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. A. Jung vom Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke danke ich für die Überlassung von Arbeitsplatz und Thema.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Jung für sein Interesse an der Arbeit, seine wertvolle Hilfe bei organisatorischen Problemen und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. M.F. Rückrich, der mir freundschaftlich sein Wissen auf dem Gebiet der Enzymkinetik vermittelte.

Herrn Dr. H.J. Reinecke, Herrn Bierbaum, Herrn Stumpp und Herrn Büthe vom Zentralen Isotopenlabor der Universität danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Problemen während meiner dortigen Arbeiten.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Koss und Herrn Dr. Weisenberger von der Firma DR. KARL THOMAE GmbH für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Diskussionsbereitschaft.

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Firma DR. KARL THOMAE GmbH durchgeführt.

Für Karin und Heike

Eines steht fest: eine objektive Beobachtung ist schwerlich möglich. Der Beobachter beeinflußt nämlich das, was er beobachten will...

Albert Einstein

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523717_0013

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL	10
2.1.	Geräte	10
2.2.	Chromatographie- und Filtermaterialien	11
2.3.	Chemikalien	11
2.4.	Prostaglandine	12
2.5.	Schweinenieren	12
3.	METHODEN	13
3.1.	Aktivitätstests für Prostaglandin-abbauende Enzyme	13
3.1.1.	Standardtest und Enzymeinheiten	14
3.2.	Bestimmung von Salzkonzentrationen	15
3.3.	Proteinbestimmungen	15
3.4.	ISOLIERUNG UND TEILWEISE CHARAKTERISIERUNG EINER NAD-ABHÄNGIGEN 15-HYDROXY-PROSTAGLANDIN DEHYDROGENASE AUS SN-CORTEX UND SN-MEDULLA	17
3.4.1.	Präparation der Schweinenieren	17
3.4.2.	Gütekontrolle der Kompartimenttrennung	18
3.4.3.	Einfluß von Ammoniumsulfatfällungen auf das chromatographische Verhalten von NAD-15HPGDH aus Schweineniere	19
3.4.4.	Versuche zur Hydrophoben Chromatographie	20
3.4.5.	Versuche zur Affinitätschromatographie	21
3.4.6.	Stabilität und Stabilisierung der NAD-15HPGDH	22
3.4.7.	ISOLIERUNG EINER NAD-15HPGDH aus SN-CORTEX	23
3.4.7.1.	Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B	23
3.4.7.2.	Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B	23
3.4.7.3.	Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B	24
3.4.7.4.	Chromatographie an Sephadex G-100	24

Seite

3.4.7.5. Chromatographie an NAD-Agarose 24
3.4.8. ISOLIERUNG EINER NAD-15HPGDH aus SN-MEDULLA 25
3.4.8.1. Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B 25
3.4.8.2. Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B 25
3.4.8.3. Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B 25
3.4.8.4. Chromatographie an Sephadex G-100 26
3.4.8.5. Chromatographie an NAD-Agarose 26
3.4.9. Analytische Disk-Elektrophoresen 26
3.4.10. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration 28
3.4.11. Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch verschiedene Faktoren 28
3.4.12. Dünnschichtchromatographische Techniken 29
3.4.13. Untersuchung der Enzymfraktionen auf Fremdaktivitäten 32
3.4.14. Durchführung und Auswertung der kinetischen Messungen 32

4. ERGEBNISSE 35
4.1. Allgemeine Untersuchungen 35
4.1.1. Gewichtsverhältnis von Cortex zu Medulla 35
4.1.2. NAD-15HPGDH-Aktivität in SN-Cortex und SN-Medulla 36
4.1.3. Gütekontrolle der Kompartimenttrennung 37
4.2. ISOLIERUNG UND TEILWEISE CHARAKTERISIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX UND SN-MEDULLA 37
4.2.1. Einfluß von Ammoniumsulfatfällungen auf das chromatographische Verhalten von NAD-15HPGDH aus Schweineniere 37
4.2.2. Versuche zur Hydrophoben Chromatographie 39
4.2.3. Versuche zur Affinitätschromatographie 41
4.2.4. Stabilität und Stabilisierung der NAD-15HPGDH 42
4.2.5. ISOLIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX 44
4.2.5.1. Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B 44

Seite

4.2.5.2. Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B 45
4.2.5.3. Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B 45
4.2.5.4. Chromatographie an Sephadex G-100 47
4.2.5.5. Chromatographie an NAD-Agarose 47
4.2.6. ISOLIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-MEDULLA 49
4.2.6.1. Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B 49
4.2.6.2. Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B 50
4.2.6.3. Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B 50
4.2.6.4. Chromatographie an Sephadex G-100 51
4.2.6.5. Chromatographie an NAD-Agarose 52
4.3. Analytische Disk-Elektrophoresen 54
4.4. Bestimmung des Molekulargewichts der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla durch Gelfiltration an Sephadex G-100 55
4.5. pH-Abhängigkeit 55
4.6. Temperaturabhängigkeit 55
4.7. Einfluß von Substanzen, die in den Enzym-, Substrat- oder Inhibitorlösungen sein können, auf die enzymatische Aktivität der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla 59
4.8. KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR HINREAKTION DER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX UND SN-MEDULLA 65
4.8.1. Kontrolluntersuchungen 65
4.8.1.1. Dünnschichtchromatographische Trennung von Prostaglandinen 65
4.8.1.2. Überprüfung der Produkte der enzymatischen Reaktion 66
4.8.1.3. Untersuchung der Enzymfraktionen auf Fremdaktivitäten 66
4.8.2. Prostaglandine als Substrate 67
4.8.2.1. NAD und PGE_2 als Substrate der Hinreaktion 67
4.8.3. Prostaglandin-Metabolite und PGB_1 als Inhibitoren der Hinreaktion 76
4.8.4. Nucleotide als Substrate und Inhibitoren der Hinreaktion 82

		Seite
4.8.5.	Produkthemmung der Hinreaktion	88
4.9.	KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR RÜCK-REAKTION DER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX UND SN-MEDULLA	98
	Tabellarische Zusammenfassung der kinetischen Konstanten der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla	108
5.	DISKUSSION	111
6.	ZUSAMMENFASSUNG	161
7.	LITERATUR	167

ABKÜRZUNGEN

A_{260}	Extinktion bei 260 nm
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	Adenosin-3',5'-monophosphat, zyklisch
cGMP	Guanosin-3',5'-monophosphat, zyklisch
DTE	Dithioerythrit
E_A	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GSH	Glutathion, reduziert
h	Stunde(n)
$13,14H_2$-15KPG	15-Keto-13,14-dihydroprostaglandin(e)
15HPGDH	15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase
HHT	12-Hydroxy-5,8,10-heptadecatriensäure
i.T.	im Testansatz
IU	internationale Enzymeinheit
KP	Kaliumphosphatpuffer
KPG	Ketoprostaglandin(e), Oxoprostaglandin(e), Dehydroprostaglandin(e)
M	molar = Mol/l
ME	2-Merkaptoethanol
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
NAD	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
NAD-15HPGDH	NAD abhängige 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (EC 1.1.1.141, Typ I 15HPGDH)
...-(SC)	NAD-15HPGDH aus Schweinenierencortex
...-(SM)	NAD-15HPGDH aus Schweinenierenmedulla
...-(Hu)	NAD-15HPGDH aus Humanplacenta
NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADH-15KPGR	15-Ketoprostaglandin-Δ^{13}-Reduktase
NADP	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidiert
NADP-15HPGDH	NADP abhängige 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (Typ II 15HPGDH)

NADPH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
NADPH-9KPGR	9-Ketoprostaglandin Reduktase
Oa.	Ordinatenabschnitt
p.A.	zur Analyse
PG	Prostaglandin(e)
PGI_2	Prostacyclin, PGX
R	Gaskonstante
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-NAD	Thionicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
St.	Steigung
T	absolute Temperatur (in Kelvin)
TCA	Trichloressigsäure
Testbdgn.	Testbedingungen
TRAP	Triethanolaminpuffer
TRIS/HCl	Trishydroxymethyl-Aminomethan-Puffer
TX	Thromboxan
U	Enzymeinheit
v	Anfangsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Nomenklatur und Abkürzungen enzymkinetischer Begriffe:

[A], [B], usw.	freie Substrat- bzw. Ligandenkonzentration
E_t	totale Enzymkonzentration
[I]	freie Hemmstoffkonzentration
k	Geschwindigkeitskonstante
K_A, K_B, usw.	Michaelis-Konstanten bei Mehrsubstratreaktionen
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante der Reaktion
K_i, K_{ii}	Hemmkonstanten bei Hemmkinetiken
K_{iA}, K_{iB}, usw.	Hemmkonstanten bei Mehrsubstratreaktionen
K_m	limitierende Michaelis-Konstante für ein Substrat bei unendlicher Konzentration des anderen Substrats (siehe K_A, K_B)
K_m app.	scheinbare Michaelis-Konstante für ein Substrat bei einer bestimmten endlichen Konzentration des anderen Substrats
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V_1	extrapolierte Maximalgeschwindigkeit der Hinreaktion
V_2	extrapolierte Maximalgeschwindigkeit der Rückreaktion
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit für ein Substrat bei einer bestimmten endlichen Konzentration des anderen Substrats

Wenn nicht ein anderer Autor speziell genannt wird, folgen Nomenklatur und Definitionen, insbesondere der Reaktionsmechanismen und Hemmtypen, denen von Cleland (44).

1. EINLEITUNG

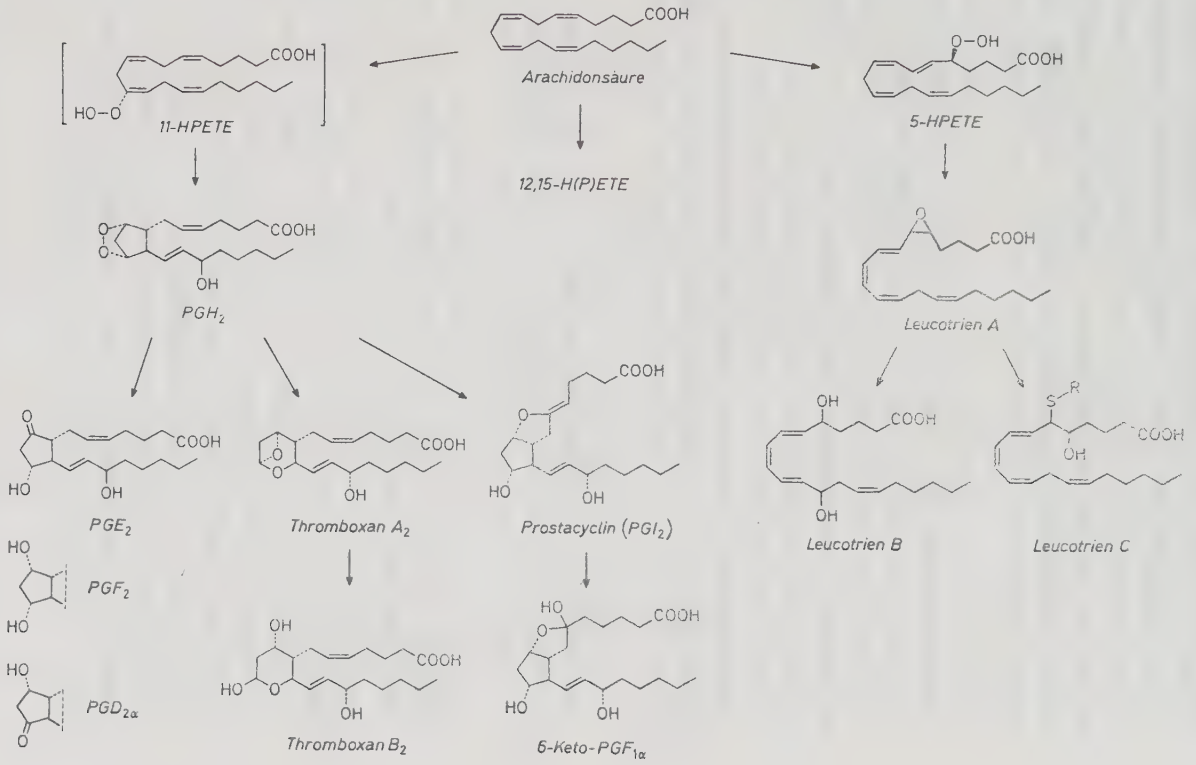
In den letzten zwanzig Jahren hat die Prostaglandinforschung explosionsartig expandiert. Seit der Entdeckung der Prostaglandine in menschlicher Samenflüssigkeit 1935 durch von Euler (67) konnte diese Substanzklasse in allen bislang untersuchten Säugetiergeweben nachgewiesen werden (68,55,39, 132,149,50). Einige der Hauptschwierigkeiten, mit denen die PG-Forschung auch heute noch zu kämpfen hat, sind die geringe Konzentration der PG in Gewebe und Körperflüssigkeiten, 10^{-11} - 10^{-7} M (68,39,8,56), die chemische Labilität dieser Stoffklasse und die spontane Stimulation oder Hemmung der PG-Synthese oder des PG-Metabolismus bei jedweder Art von Untersuchungsvorgängen (181).

Jedem, der aufmerksam die Prostaglandinliteratur verfolgt, wird aufgefallen sein, daß Arbeiten zum gleichen Thema, aber mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden durchgeführt, nicht selten zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.

Mit der Einführung der GC-MS zur Bestimmung und Identifizierung der PG zeigte sich immer deutlicher, daß Arachidonsäure die Ausgangssubstanz für eine noch nicht überschaubare Kaskade biologisch hochaktiver Fettsäuren ist. Als Metaboliten der Arachidonsäure fand man im Laufe der Zeit die Prostaglandine, die Thromboxane und Prostacycline, diverse Hydroxyeicosatetraensäuren und neuerdings eine weitere interessante Substanzklasse, die Leucotriene (182,167). Abb. 1 gibt einen Überblick über die Vielfalt des Arachidonsäuremetabolismus.

In den letzten Jahren ist die Niere als Prostaglandin-metabolisierendes Organ immer stärker ins Blickfeld der Prostaglandinforschung gerückt. Prostaglandine werden vom Gewebe nicht bevorratet, sondern nach Bedarf aus endogenen Fettsäuren (Eicosatetraensäure, Eicosatriensäure) synthetisiert. Sie wirken gewöhnlich nur in nächster Nähe ihres Syntheseortes und werden dort sofort durch sehr aktive Dehydrogena-

Abb. 1: Schematische Darstellung der oxidativen Metabolisierung und Transformation der Arachidonsäure



sen zu biologisch inaktiven Formen (15-Keto-PG, 13-14H_2-15-Keto-PG) metabolisiert. Dieser Mechanismus erscheint sinnvoll, da die Prostaglandine gewebespezifische Wirkungen zeigen, d.h. ein Zirkulieren größerer PG-Mengen in den Körperflüssigkeiten für den Organismus fatale Folgen hätte. Das Nierenmark hat eine der höchsten PG-Synthese-Aktivitäten, wohingegen die Nierenrinde eine der höchsten PG-Dehydrogenase-Aktivitäten hat. Außerdem ist die Niere ein wichtiges Organ für die Prostaglandinexkretion. Sie akkumuliert exogene Prostaglandine zu Konzentrationen, die die Plasmakonzentration übertreffen (147) und ist dafür verantwortlich, daß 50 - 80 % der körpereigenen Prostaglandine über den Urin ausgeschieden werden. Diese Gründe und das vielseitige Wirkungsspektrum der PG in der Niere selbst (siehe unten) lassen hoffen, daß mit der Niere ein Organ zur Verfügung steht, mit dessen Hilfe man Einsicht in den verwirrenden Regulations- und Wirkmechanismus der PG gewinnen kann.

Prostaglandine, Thromboxane und Prostacycline werden in den Microsomen, vornehmlich dem endoplasmatischen Reticulum, aus Arachidonsäure synthetisiert (11,29). Die Synthese erfolgt über eine Gruppe membrangebundener Enzyme, der sogenannten Prostaglandinsynthetase, die aus Cyclooxigenasen, Peroxidasen, Isomerasen und Reduktasen besteht (181,23). Nieren-Medulla und -Pappilla aller untersuchten Spezies zeigten eine hohe PG-Synthetase-Aktivität (11,46,26,58,126), die Synthetase-Aktivität in Nieren-Cortex ist wesentlich geringer (58,126,127,165). Dunn (59) fand bei Kaninchen und Ratten ein Verhältnis der PG-Synthetase-Aktivitäten zwischen Papilla, Medulla und Cortex von 100:10:1. Mit Immunofluoreszenzmethoden konnte die PG-Synthetase hauptsächlich in den Epithelzellen des corticalen und medullären Sammelrohres, den arteriellen vasculären Endothelzellen und den medullären Interstitialzellen lokalisiert werden (195,196,198). In vivo wird die Aktivität der PG-Synthetase wahrscheinlich über die Substratverfügbarkeit gesteuert (48,231,113,110, 146), da kein bekanntes Stimulans der PG-Biosynthese die PG-Synthetase oder die PG-Isomerase direkt stimuliert. Dieser

Mechanismus wird durch die Tatsache unterstützt, daß Peptidhormone wie Bradikinin, Angiotensin II und Arginin-Vasopressin zwar die PGE_2-Synthese in in vivo- und Zellkulturexperimenten bis zu 20-fach steigern können (230,231,107,112,60), in in vitro-Experimenten jedoch keinen Effekt zeigen. Die Wirkung dieser Peptidhormone liegt damit wohl in einer Stimulation der Phospholipase-Aktivität. Auch die entzündungshemmenden Pharmaka zeigen ein unter diesem Aspekt interessantes Verhalten. Corticosteroide hemmen die PG-Synthese über eine Verminderung der Arachidonsäurefreisetzung aus den Phospholipidspeichern, haben jedoch keinen Effekt auf die isolierten PG-Synthese-Enzyme. Nichtsteroidale entzündungshemmende Substanzen wie Indomethazin und Aspirin hemmen die PG-Synthese-Enzyme hingegen direkt (106).

Bezüglich der Art und der Quantitäten der in den unterschiedlichen Regionen der Niere synthetisierten PG herrscht in der Literatur kein einheitliches Bild (220,229,218,193, 89,200,70,30,231,230,60,211,199). Hält man sich die Instabilität der Endoperoxide, die den Verzweigungspunkt der PG-Synthese darstellen, wie auch die absolute Abhängigkeit der unterschiedlichen PG-synthetisierenden Enzymsysteme von unterschiedlichen spezifischen Cosubstratkonzentrationen (Cyclooxigenase: Hämin; Peroxidase: Phenolkörper; Isomerasen: reduziertes Gluthation) und vor allem deren Oxidationsempfindlichkeit vor Augen, so sind diese oft widersprüchlichen Ergebnisse nicht verwunderlich. Obwohl in Cortex wie auch in Medulla fast alle PG, d.h. PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, PGD_2, PGA_2, PGI_2 in unterschiedlichen Mengenverhältnissen gefunden wurden, ist aufgrund dieser Unwägbarkeiten anzunehmen, daß in Medulla rein enzymatisch nur PGE_2 und PGI_2 und in Cortex in geringen Mengen $PGF_{2\alpha}$, PGE_2 und PGI_2 gebildet werden. Die PG-Synthese in Medulla ist ca. vier- bis zehnmal größer als in Cortex. Eine "normal" verlaufende PG-Synthese ist jedoch nur dann gewährleistet, wenn die Isomerasen unbeeinträchtigt arbeiten können (eigenes unveröffentlichtes Ergebnis). Dies ist jedoch nur dann der Fall, wenn ihre Kapazität nicht durch ein zu hohes Substratangebot überfordert wird,

wenn immer genügend reduziertes Gluthathion zur Verfügung steht und wenn ihre Aktivität nicht durch artifizielle oxidative Vorgänge beeinträchtigt wird. PGA_2, PGD_2 und ein großer Teil der $PGF_{2\alpha}$ sind deshalb als Aufarbeitungsartefakte und Zerfallsprodukte überschüssiger Endoperoxide, die durch eine im Experiment entgleisende PG-Biosynthese-Kaskade entstehen, zu betrachten.

In der Niere sind alle Enzymsysteme gefunden worden, die man auch aus Studien an anderen Geweben als für den PG-Katabolismus verantwortlich kennt. Sowohl in Cortex wie in Medulla aller untersuchten Spezies wurde, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.141) (227,88,205) gefunden. Dieses Enzym, die sogenannte Typ I 15HPGDH, ist streng NAD-abhängig und katalysiert spezifisch die Oxidation der 15-(S)-Hydroxylgruppe der Prostaglandine der E-, F-, A-, D- und I-Reihen zur Ketogruppe, d.h. den ersten und wichtigsten Abbauschritt der Prostaglandine. Anatomisch ist die NAD-15HPGDH hauptsächlich im Cortex (126) und da in den distalen und proximalen Tubuli (148,223) lokalisiert. Die NAD-15HPGDH hat nur eine sehr kurze biologische Halbwertszeit. In Rattenniere war ihre enzymatische Aktivität schon 4 h nach Gabe von Proteinbiosyntheseblockern wie Puromycin oder Cycloheximid um 80 % vermindert (27).

Neben der NAD-15HPGDH werden in den Nieren aller untersuchter Spezies eine NADP-abhängige 15HPGDH und eine NADPH-abhängige 9-Ketoprostaglandin-Reduktase (9-KPGR) beschrieben. In neuerer Zeit hat sich herausgestellt, daß beide enzymatischen Aktivitäten ein und demselben Protein zuzuordnen sind, der sogenannten Typ II 15HPGDH (40,126,202,12). Die Typ II 15HPGDH kommt sowohl in Cortex wie auch in Medulla vor. Die Verteilung auf die beiden Kompartimente ist jedoch stark speziesabhängig. Die Gesamtaktivität an Typ II 15HPGDH in der Niere, wie auch deren Spezifität für Prostaglandine, ist durchschnittlich um zwei Zehnerpotenzen geringer als die der Typ I 15HPGDH. Meist kommt das Enzym in beiden Kompartimenten der Niere in mehreren molekularen Formen vor, die

sich über eine isoelektrische Fokussierung voneinander trennen lassen. Die Beurteilung der Bedeutung dieses Enzyms für den PG-Metabolismus wird abgesehen von seiner geringen Spezifität für PG selbst dadurch erschwert, daß es dazu in der Lage ist, 5α-Dihydrotestosteron mit NADPH rasch zu reduzieren (203). Offensichtlich ist die Typ II 15HPGDH für Oxidations-Reduktions-Reaktionen an sowohl Prostaglandinen wie auch Steroiden verantwortlich.

Der nächste Schritt der PG-Metabolisierung, die Reduktion der Δ^{13}-Doppelbindung der über die 15HPGDH-Reaktion entstandenen 15-Keto-Prostaglandine, ist in der Niere wenig untersucht. Das diesen Schritt katalysierende Enzym, die 15-Keto-prostaglandin Δ^{13}-Reduktase wurde zwar in Niere gemessen (158,10), jedoch noch nicht gereinigt und charakterisiert. Einige Kenntnisse bestehen jedoch aus Isolierungen aus Ochsenlunge (87) und Humanplacenta (219,184). Das Enzym wird als spezifisch für die 15-Keto-Prostaglandine der E-, F-, D- und I-Reihe beschrieben. Die Reaktion benötigt NADH oder NADPH und ist irreversibel. Die in unterschiedlichen Geweben gemessenen enzymatischen Aktivitäten dieses Enzyms sind ausnahmslos sehr gering.

Im Cortex der Nieren von Ratten und Kaninchen wurde in geringen Aktivitäten ein weiteres PG-metabolisierendes Enzym gefunden, die 9-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (157, 140). Dieses NAD-abhängige Enzym katalysiert die Oxidation der 9α-Hydroxy-Gruppe der 13,14-Dihydro-15-Keto-$PGF_{1\alpha}$ und -$PGF_{2\alpha}$ zu den entsprechenden PGE. Die Bedeutung dieser Umwandlung ist jedoch unklar.

Wie alle anderen Organe ist natürlich auch die Niere dazu in der Lage, Fettsäuren, damit auch Prostaglandine, über die microsomale β-Oxidation abzubauen. Eine ω- und ω-1-Hydroxylierung von Fettsäuren wurde zwar in Microsomen aus Nierencortex nachgewiesen (65), scheint jedoch für die PG-Inaktivierung nur von geringer Bedeutung zu sein.

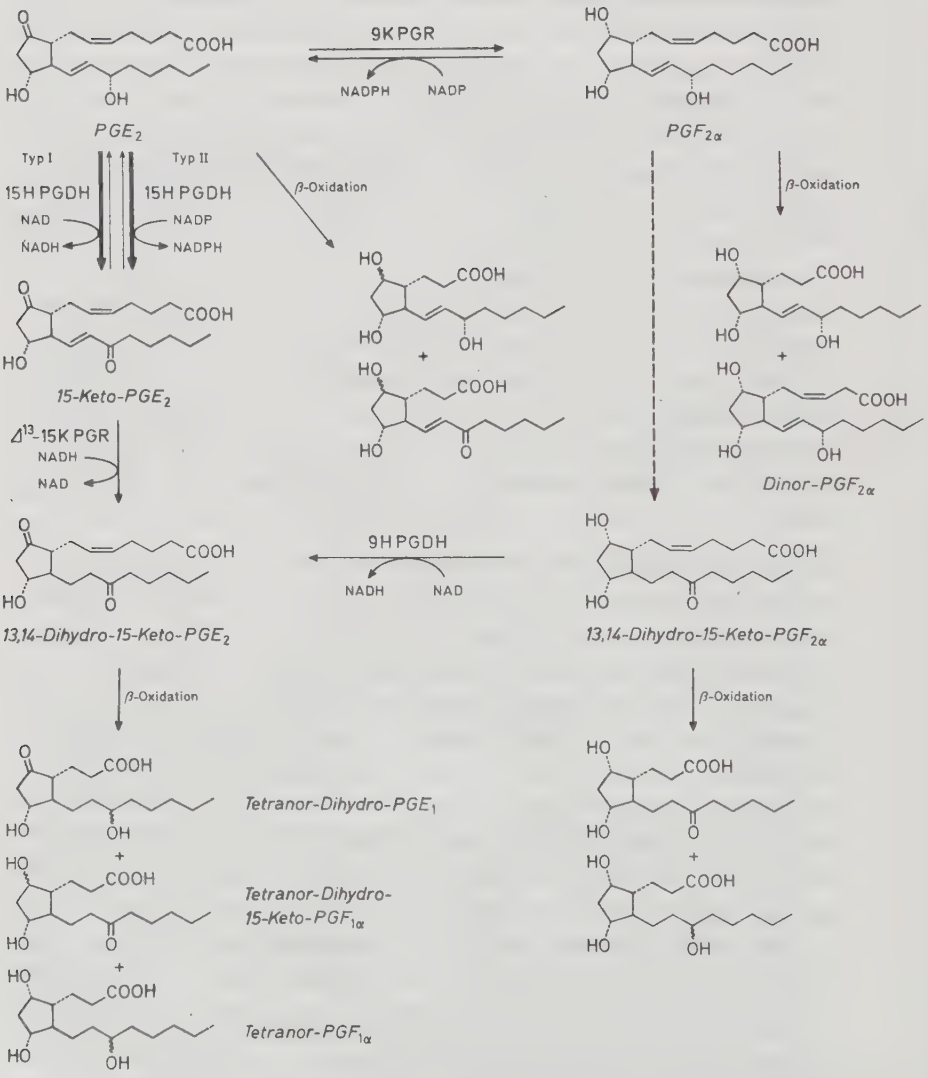
Betrachtet man nun diese Kaskade des PG-Metabolismus, so stellt sich die Frage, welcher dieser enzymatischen Schritte für die PG-Inaktivierung in der Niere wesentlich ist.

Zirkulierende Prostaglandine werden glomerulär filtriert und über das Transportsystem für organische Anionen tubulär sekretiert (169,111,25), wobei sie fast vollständig metabolisiert werden. Durch andere organische Anionen wie z.B. Indomethacin und Probenecid kann die tubuläre Sekretion der PG kompetitiv gehemmt werden. Ähnlich wie die Lunge (69,108, 164,180) hat die Niere eine bedeutende Funktion bei der Inaktivierung zirkulierender PG. Die Inaktivierung dieser PG könnte entweder über die NAD-15HPGDH-Reaktion oder über eine ß-oxidative Kettenverkürzung (84,204,224) erfolgen (siehe Abb. 2). Die Frage, welche dieser beiden Möglichkeiten der PG-Inaktivierung für die Niere Bedeutung besitzt, kann jedoch erst durch zukünftige Untersuchungen entschieden werden. Die kurze biologische Halbwertszeit, wie auch die verminderte Aktivität der NAD-15HPGDH bei essentieller Hypertonie (159,12), sind Anzeichen dafür, daß die NAD-15HPGDH eine bedeutende Rolle bei der Regulation der intrarenalen PG-Aktivitäten spielen könnte. Aus diesem Grunde wurde auch der diuretische Effekt einiger Pharmaka, wie Furosemid, Bumetanid und Ethacrynsäure, mit deren Hemmung der 15HPGDH-Aktivität in Verbindung gebracht (227,88,20,197).

Trotz der postulierten Schlüsselstellung der NAD-15HPGDH bei der Regulation des endogenen PG-Spiegels der Niere wurden bislang nur sehr zaghafte Versuche unternommen, dieses Enzym zu isolieren und zu charakterisieren (206,207,205, 128,208,152,223,125,88). Eine Chance, die Stellung der NAD-15HPGDH innerhalb dieses Regulationsmechanismus richtig zu beurteilen, besteht jedoch nur, wenn ausreichend viele Daten dieses Enzyms bekannt sind. Isolierte, gut charakterisierte NAD-15HPGDH könnte ein wichtiges Instrument bei der Aufklärung der noch unklaren Rolle der renalen PG bei essentieller Hypertonie, Bartter's Syndrom, Regulation des RBF und der Regulation der Salz- und Wasserexkretion werden (61, 186,217,51,223,209,129). Das Ziel dieser Arbeit war deshalb:

1. Eine neuartige Isolierung für NAD-15HPGDH aus Niere auszuarbeiten, die hohe Anreicherungen bei möglichst schonender Behandlung des Enzyms garantiert.

Abb. 2: Schematische Darstellung des PG-Metabolismus in der Niere



2. Cortex und Medulla getrennt aufzuarbeiten, um eine Beurteilung der quantitativen und qualitativen Verteilung der NAD-15HPGDH auf diese beiden Kompartimente abgeben zu können.
3. Die gereinigten Enzyme aus Cortex und Medulla möglichst weitgehend molekular und kinetisch zu charakterisieren, um mögliche Unterschiede untereinander aufzeigen zu können und um einen Vergleich mit isolierter und charakterisierter NAD-15HPGDH anderer Spezies und Gewebe zu ermöglichen.

Wie schon oben erwähnt, ist die Verteilung der PG-generierenden und PG-metabolisierenden Systeme in der Niere stark speziesabhängig. Um möglichst weitgehend auch auf den Menschen übertragbare Verhältnisse vorzufinden, wurden als Ausgangsmaterial Schweinenieren gewählt. Bekanntermaßen sind Schweine dem Menschen physiologisch ähnlicher als Hunde, Katzen, Kaninchen und Ratten, die sonst üblicherweise als Versuchstiere verwendet werden. Außerdem verfügen Schweinenieren über eine außergewöhnlich hohe NAD-15HPGDH-Konzentration (10) und sind ohne großen Aufwand in beliebiger Menge verfügbar.

2. MATERIAL

2.1. GERÄTE

Beckman Acta M VI Spektralphotometer mit thermostatisierter Küvettenautomatik und integriertem Schreiber, Beckman Spektralphotometer DB-GT mit 10" Recorder (BECKMAN); Spektralphotometer PM 6 (ZEISS, Oberkochen); Durchlaufphotometer Uvicord 4701 A und Uvicord III mit Recordern LKB 6520 A und 6520-8, Fraktionssammler Ultrorac (LKB-PRODUKTOR AB); Fraktionssammler Linear II mit Steuerzelle (SERVA); Ultra-Thermostat (COLORA MESSTECHNIK); Thermostat (BRAUN); Flachgel-Disk-Elektrophorese-Apparatur 146200; Röhrchengelelektrophoreseapparatur 75156; Diffusionsentfärbeapparatur (DESAGA); pH-Meter Metrohm E 512; pH-Meter PHM28c (RADIOMETER); pH-Meter pH 71 (KNICK); pH-Einstabmeßketten N 61 und N 68 (SCHOTT); Mikro Rapid Zentrifuge (HETTICH); RC-5 Superspeed mit Rotoren GS 3, GSA, SS 30 (SORVALL); TGA-75 Ultrazentrifuge (KONTRON) mit Rotoren 45 Ti, 60 Ti, 75 Ti (BECKMAN); Pumpe Minipuls II (GILSON); Beta-Kamera BF 290 A, DC-Scanner II LB 2723 (BERTHOLD); Potentiometerschreiber RE 571 (METRAWATT); Tricarb-Liquid-Scintillation Counter 2650 (PACKARD); Mikropipetten (EPPENDORF, GILSON, LABORA, OXFORD); Starmix-Homogenisator (ELEKTROSTAR); Potter-Elvehjem-Homogenisator und Dounce-Glashomogenisator (BRAUN); Vortex-Genie (SCIENTIFIC INDUSTRIES INC.); Waagen: ME 22 (BA 25, BE 22), M 5, B 5 und P 1200 (METTLER); Sandwichkammern (5 x 5 und 10 x 10) für die Dünnschichtchromatographie (EIGENBAU); Circular-Dünnschicht-Chromatograph GLM 78 mit Auftragetisch (10 x 10), Entwicklungstisch, Gradientenmischer und Fließmittelpumpe (Prototyp der Firma BERGHOF LABORTECHNIK); Leitfähigkeitsmeßgerät PW 9505 (PHILIPS).

2.2. CHROMATOGRAPHIE- UND FILTERMATERIALIEN

Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50, DEAE-Sepharose CL-6B, Blue-Sepharose CL-6B, Octyl-Sepharose CL-4B, Phenyl-Sepharose CL-4B, Thiopropyl-Sepharose 6B (PHARMACIA FINE CHEMICALS); DEAE-Cellulose DE 23, Glasfaserfilter GF/C (WHATMAN); Agarose-Hexan-Nicotinamid Adenin Dinucleotid AGNAD^{TM} Type 1, 3 und 4 von P-L BIOCHEMICALS (SERVA INTERNATIONAL); β-Nicotinamid Adenin Dinucleotid-Agarose (SIGMA); DC-Karten SI (RIEDEL DE HÄEN); Polygram SIL G/UV$_{254}$, Nano-Platten SIL 20 (MACHERY, NAGEL & CO.); HPTLC-Alufolie Si 60 (20 x 20), HPTLC Si 60-Platten (10 x 10) mit und ohne Fluoreszenzindikator,Si 60-Platten mit Konzentrierungszone (MERCK); Celluloseacetatstreifen (SARTORIUS); Selectron-Filter BA 90 (SCHLEICHER & SCHÜLL).

2.3. CHEMIKALIEN

Adenosin-5'-monophosphorsäure (5'AMP) (BOEHRINGER); β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form, Grade V (NAD); β-Nicotinamid-adenin-dunucleotid, reduzierte Form, Dinatriumsalz, Grade III (NADH); β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidierte Form, Natriumsalz, Sigma Grade (NADP); Thionicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form (S-NAD); Adenosin-3':5'-monophosphat, zyklisch, Natriumsalz (c-AMP); Guanosin-3':5'-monophosphat, zyklisch, Natriumsalz (c-GMP) (SIGMA);

Rinderserumalbumin, rein; Ovalbumin, reinst (SERVA); Rinderserumalbumin, 1 x krist.; Myoglobin, Type II (SIGMA); Alkalische Phosphatase aus E. coli; Cytochrom C aus Pferdeherz (BOEHRINGER).

Triethanolamin·HCl, p.a., schwermetallfrei; 2-Mercaptoethanol, reinst; Amidoschwarz 10B extra, reinst; Coomassie brillant blau G-250, rein; p-Nitro-blautetrazoliumchlorid, p.A.; Phenazin methosulfat, rein; Triton X-100, p.A.; Dodecylsul-

fat, Natriumsalz, reinst (SDS); Sucrose, special enzyme grade (SCHWARZ/MANN); Dithioerythrit (SIGMA); Phosphormolybdänsäure, p.a. (RIEDEL DE HÄEN); Trichoressigsäure, D.A.B. 7 (HOECHST).

Alle anderen Chemikalien waren von p.a.-Qualität (MERCK). Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen mit aqua bidest. (doppelt destilliertem Wasser) angesetzt.

2.4. Prostaglandine

Die Prostaglandine PGE_1, PGE_2, $PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$, PGA_1, PGB_1, PGD_1, PGD_2, $15KPGE_1$, $15KPGE_2$, $15KPGF_{1\alpha}$, $15KPGF_{2\alpha}$, $15KPGA_1$, $13,14H_2\text{-}15KPGE_1$, $13,14H_2\text{-}15KPGE_2$, $13,14H_2\text{-}15KPGF_{1\alpha}$ und $13,14H_2\text{-}15KPGF_{2\alpha}$ entstammen einem Fundus, der unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von der UPJOHN COMPANY überlassen wurde.

Außerdem wurden verwendet: PGE_2 von SIGMA, $1\text{-}^{14}C\text{-}PGE_2$ von AMERSHAM BUCHLER, $^3H\text{-}15KPGE_1$ von NEN.

2.5. Schweinenieren

Die verwendeten Schweinenieren wurden jeweils frisch vom Tübinger Schlachthof bezogen. Sie wurden direkt nach der Schlachtung in Eis gelegt und noch dort veterinärmedizinisch begutachtet. Vom Zeitpunkt der Schlachtung bis zum Beginn der Präparation im Kühllabor vergingen in jedem Fall höchstens 30 min.

3. METHODEN

3.1. Aktivitätstests für Prostaglandin-abbauende Enzyme

Für die enzymatischen Aktivitätstests wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Hinreaktion der jeweiligen enzymatischen Umsetzung ausgenutzt.

A) NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase, Abkürzung: NAD -15HPGDH

$NAD^+ + PG \longrightarrow NADH+H^+ + 15\text{-Keto-PG}$

B) NADP-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase, Abkürzung: NADP-15HPGDH

$NADP^+ + PG \longrightarrow NADPH+H^+ + 15\text{-Keto-PG}$

C) NADPH-abhängige 9-Ketoprostaglandin Reduktase, Abkürzung: NADPH -9KPGR

$NADPH+H^+ + PGF_{2\alpha} \longrightarrow NADP^+ + PGE_2$

D) NADH-abhängige 13,14-Dihydro-15-Ketoprostaglandin Reduktase, Abkürzung: NADH -15KPGR

$NADH+H^+ + 15\text{-Keto-}PGE_2 \longrightarrow NAD^+ + 13,14\text{-}H_2\text{-15-Keto-PG}$

Die NADH-Bildung bzw. NADPH- oder NADH-Abnahme wurde in schwarzen MT4/QS-Küvetten (Volumen des Ansatzes: 1 ml) mit Hilfe eines Beckman Acta M VI Spektrophotometers mit thermostatisierbarer Küvettenautomatik und Schreiber bei 340 nm verfolgt. In der Referenzküvette befand sich ein bis auf die PG vollständiger Ansatz, der auch die Lösungsmittel für die PG enthielt. Nach einer 5 min dauernden Vorinkubation des das Enzym und alle sonstigen Zusätze enthaltenden Reaktionsgemisches wurde mit PG gestartet.

Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wurde aus der Steigung des linearen Bereichs der Schreiberkurve ermittelt. Dabei wurde ein Extinktionskoeffizient von 6,22 $cm^2/\mu mol$ zugrunde gelegt.

Die PG wurden in kleinen Portionen eingewogen, bei -40°C

aufbewahrt, bei Bedarf frisch in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (KP) pH 7,0 gelöst und nur am gleichen Tag verwendet.

3.1.1. Standardtest und Enzymeinheiten

Die enzymatische Aktivität aller PG-abbauender Enzyme wurde, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C und pH 7,4 (i.T.) in Triethanolaminpuffer (TRAP) nach folgendem Standardtestschema ermittelt (Volumen des Testansatzes: 1 ml).

Lösungen	Volumen i.T. (µl)	Konzentration i.T. (mM)
200 mM TRAP, pH 7,4 (37°C)	600	100
Nucleotid (NAD, 10 mM)	200	(2)
Probelösung	n	
H_2O (bidest)	250-(n+m)	
5 min Vorinkubation bei 37°C		
PG (PGE_2, 2mM) Start	m	(0,1)

Die Konzentrationen der Co-Substrate und PG im Standardtest waren, wenn nicht anders angegeben, mindestens 100-fach über K_m. Genaue Konzentrationsangaben befinden sich in den jeweiligen Abbildungslegenden.

Eine Enzymaktivität von 1 mU entspricht der Bildung bzw. dem Verschwinden von 1 n Mol NADH bzw. NADPH pro Minute unter Standardtestbedingungen. Die Enzymkonzentration in der Probelösung, d.h. die Volumenaktivität, wird in mU/ml angegeben, die spezifische Aktivität entsprechend in mU/mg Protein.

3.2. Bestimmung von Salzkonzentrationen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Salzkonzentrationen (KCl, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, KP) über Leitfähigkeitsmessungen gegen eine entsprechende Eichkurve ermittelt.

Phosphatbestimmung: Die Phosphatkonzentrationen in den Säuleneluaten wurden entweder über Leitfähigkeitsmessungen oder nach der folgendermaßen modifizierten Methode von Baginski et al. (15) bestimmt.

Lösung A: 2 % Ascorbinsäure (w/w), 10 % TCA (w/v),
Lösung B: 1 % Ammoniummolybdat (w/v),
Lösung C: 2 % Natriumcitrat (w/v), 2 % Natriumarsenit (w/v), 2 % Eisessig (v/v).

Testansatz: Unter Mischen wurden 0,1 ml Probelösung mit 0,9 ml Lösung A, 0,5 ml Lösung B und 1 ml Lösung C versetzt und 15 min zur Farbentwicklung bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Messung erfolgte bei 840 nm gegen einen Leerwert ohne Phosphat, Eichkurve: KP, pH 7,4. Es wurden stets Mehrfachbestimmungen durchgeführt. War die Proteinkonzentration in der Probe hoch, so wurde das Protein zunächst über eine TCA-Fällung entfernt, dann erst die Phosphatbestimmung durchgeführt.

3.3. Proteinbestimmungen

Die Proteinkonzentrationen in den Säuleneluaten wurden soweit möglich direkt über einen eichbaren Mahrkanal-Durchflußmonitor mit Schreiber oder durch Messen der Extinktionen der Einzelproben bei 260 nm und 280 nm gegen den Elutionspuffer ermittelt (Methode A_{260}/A_{280}). Proben mit Extinktionen über 0,6 wurden mit Elutionspuffer entsprechend verdünnt. Die Berechnung erfolgte nach Kalckar (119):

$$\text{mg Protein/ml} = 1{,}4 \times A_{280} - 0{,}74 \times A_{260}.$$

Proteinbestimmung für Proteinkonzentrationen über 0,1 mg/ml in Einzelfraktionen: Die Methode von Heinzel et al. (90) wurde wie folgt modifiziert:
Färbelösung: 0,5 % Amidoschwarz 10B (w/v), 45 % Methanol (v/v), 45 % aqua bidest (v/v), 10 % Eisessig (v/v),
Entfärbelösung: 47,5 % Methanol (v/v), 47,5 % aqua bidest (v/v), 5 % Eisessig (v/v),
Elutionslösung: 25 % Natriumoxalat (v/v, gesättigt in aqua bidest), 75 % Methanol (v/v). Die Lösung wurde filtriert bis sie klar war.
Die Probe wurde in 0,1 N NaOH auf eine vorher in Felder eingeteilte trockene Celluloseacetatfolie aufgetragen und getrocknet. Die so präparierten Folien wurden 10 min in der Färbelösung gefärbt, anschließend dreimal 3 min in jeweils frischer Entfärbelösung entfärbt und getrocknet. Die getrockneten Folien wurden in die markierten Felder zerschnitten und der Farbstoff der Probenfelder bei Zimmertemperatur unter Schütteln mit der Elutionslösung eluiert.
Eichkurve: Rinderserumalbumin in 0,1 N NaOH.
Die Messung erfolgte bei 620 nm gegen den entsprechenden Leerwert.

Proteinbestimmung für Proteinkonzentrationen unter 0,1 mg/ml in Einzelfraktionen: Hierzu wurde die Methode von Schaffner & Weissmann (183) folgendermaßen modifiziert:
SDS-Puffer, pH 7,5: 500 mM TRIS/HCl, 1 % SDS (v/v),
Färbelösung: 0,1 % Amidoschwarz 10B (w/v), 45 % Methanol (v/v), 45 % aqua bidest (v/v), 10 % Eisessig (v/v),
Entfärbelösung: 90 % Methanol (v/v), 8 % aqua bidest (v/v), 2 % Eisessig (v/v),
Elutionslösung: 25 mM NaOH, 0,05 mM EDTA, 50 % Ethanol (v/v).

Die Probelösung (wenn nötig mehrere ml) wurde mit SDS-Puffer und 80 %iger TCA im Verhältnis 2:1:1 versetzt, gemischt und 5 min stehen gelassen. Diese Ansätze wurden in 5 %iger TCA quantitativ über einen Filtrierstutzen (Innendurchmesser 12 mm; Institutswerkstatt) auf Nitrocellulosefilter (Ø 18 mm) gesaugt und gründlich mit 5 %iger TCA nachgewa-

schen. Die Filterplättchen wurden nun mit je 4 ml Färbelösung gefärbt (10 min), mit aqua bidest gespült, anschließend fünfmal 5 min in jeweils frischer Entfärbelösung entfärbt und nochmals mit aqua bidest gewaschen. Unter Schütteln wurde nun der proteingebundene Farbstoff mit 1,5 ml Elutionslösung eluiert. Die Messung erfolgte in 2 mm MT4/QS-Küvetten mit Fuß. Gemessen wurde bei 630 nm gegen einen entsprechenden Leerwert. Für jede Meßreihe wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin hergestellt. Bei genügend großer Probenmenge ist diese Bestimmungsmethode auch für Proteinkonzentrationen unter 1 µg/ml ausreichend. Es wurden stets Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

3.4. ISOLIERUNG UND TEILWEISE CHARAKTERISIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX UND SN-MEDULLA

3.4.1. Präparation der Schweinenieren

Die schlachtfrischen Schweinenieren wurden noch im Schlachthof auf Eis gebettet. Vom Zeitpunkt der Schlachtung bis zum Beginn der Präparation verging maximal eine halbe Stunde (unter Eiskühlung). Die Präparation und alle weiteren Schritte der Aufarbeitung erfolgten im Kühllabor bei 4°C.

Die Schweinenieren wurden vom Bindegewebe getrennt und sorgfältig in cortikalen und medullären Anteil zerlegt. Es wurde sehr darauf geachtet, daß keine Kontamination durch das jeweilige andere Kompartiment auftrat. Im Zweifel wurde ein Gewebeverlust in Kauf genommen. Aus dem medullären Gewebe wurde anschließend der Bindegewebsanteil herauspräpariert und verworfen.

Cortex und Medulla der jeweiligen Präparation wurden separat gewogen, zerkleinert und mit dem 4-fachen Volumen an Puffer A (50 % des Puffers waren tiefgefroren) in einem Starmix-Homogenisator zweimal 2 min bei höchster Stufe un-

ter Temperaturkontrolle ($t < 0^{o}C$) homogenisiert. Die Homogenate wurden in einer Sorvall RC-5 Zentrifuge 30 min bei 13 000 x g (r = av.) zentrifugiert und die Überstände zur Entfernung der Fettschicht durch Filterwatte filtriert. Anschließend wurden die 13 000 x g - Überstände von Cortex und Medulla in einer Kontron TGA-75 Zentrifuge (Rotor: Beckman, 45 Ti) 1 h bei 130 000 x g (r = av.) zentrifugiert. Zur Entfernung der Lipidschicht wurden die Überstände durch Glasfasermembranen filtriert.

Die weitere Aufarbeitung der 130 000 x g - Überstände der jeweiligen Cortex- und Medulla-Präparationen erfolgte ohne zeitliche Verzögerungen. Die zur Isolierung der NAD-15HPGDH beider Kompartimente notwendigen Chromatographieschritte wurden simultan durchgeführt.

3.4.2. Gütekontrolle der Kompartimenttrennung

Zur Kontrolle der Güte der präparativen Trennung der beiden Nierenkompartimente wurde das stark unterschiedliche Verhalten der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex bzw. SN-Medulla gegenüber dem hydrophoben Material Phenyl-Sepharose Cl-4B (siehe 4.2.2.) ausgenutzt. Wenige ml der 130 000 x g - Überstände des jeweiligen Kompartiments wurden 500 mM an KCl gemacht und auf mit 100 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 mM ME, 20 % Glycerin, 500 mM KCl äquilibrierte Phenyl-Sepharose-Säulchen (V = 0,5 ml; 1 ml Einmalspritze als Säule) aufgetragen und mit je 2 ml Puffer nachgewaschen.

Elution der Medulla-Säule:

1. Stufe: 2 ml 10 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 mM ME, 50 % Glycerin; 2. Stufe: 2 ml 50 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0,5 mM ME, pH 7,4.

Elution der Cortex-Säule:

1. Stufe: 2 ml 2 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 mM ME, 50 % Glycerin; 2. Stufe: 50 % Glycerin, 0,5 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 0,5 mM ME, pH 7,4.

Alle Fraktionen wurden mit dem optischen Standardtest (3.1.1.) und mit radioaktiven Inkubationsansätzen mit NAD und 1-^{14}C-PGE_2 auf NAD-15HPGDH-Aktivität hin untersucht. Die Inkubationsansätze wurden extrahiert und die Reaktionsprodukte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (siehe 3.4.3. und 3.4.12.). Die so erhaltenen DC-Platten wurden mit einem DC-Scanner mit Simultanschreiber quantitativ ausgewertet.

3.4.3. Einfluß von Ammoniumsulfatfällungen auf das chromatographische Verhalten von NAD-15HPGDH aus Schweineniere

Eine schlachtfrische Schweineniere wurde sorgfältig in Cortex und Medulla zerlegt und die beiden Kompartimente getrennt, wie unter 3.4.1. beschrieben, bis zu den 130 000 x g-Überständen aufgearbeitet. Die 130 000 x g - Überstände wurden halbiert. Je ein Teil des Überstandes eines Kompartiments wurde direkt auf eine DEAE-Sephadex A-50 Säule aufgetragen. Der andere Teil wurde jeweils 60 % mit Ammoniumsulfat gesättigt, 1 h in der Kälte gerührt und das Präzipitat abzentrifugiert. Die so erhaltenen Proteinniederschläge wurden in Puffer A (100 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 20 % Glycerin) gelöst und so lange gegen Puffer A dialysiert, bis die Leitfähigkeit des Dialysats der von Puffer A entsprach. Die Dialysate wurden anschließend auf DEAE-Sephadex A-50 Säulen aufgetragen.

Alle vier verwendeten DEAE-Sephadex Säulen hatten gleiche Gelabmessungen (V = 100 ml) und waren mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftrag der UZ-Überstände bzw. der Dialysate wurden die Säulen mit jeweils 200 ml Puffer A gewaschen und anschließend mit linearen steigenden KCl-Gradienten eluiert. Sowohl die Durchläufe wie auch die Eluate der Säulen wurden mit der unter 3.1. beschriebenen optischen Testmethode und Inkubationsansätzen mit NAD und 1-^{14}C-PGE_2 auf

NAD-15HPGDH-Aktivität hin untersucht.

Inkubationsansatz: (1 ml); TRAP, pH 7,4 (100 mM i.A.), Enzymprobe, NAD (2 mM i.A.), PGE_2 kalt (0,1 mM i.A.), 1-^{14}C-PGE_2 (2 nCi i.A.). Alle Ansätze wurden mit PG gestartet und 45 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in je 1 ml -40°C kalten HCl-sauren Essigester (pH 3,1) pipettiert, zweimal je 10 s gevortext, zentrifugiert und die organische Phase abpipettiert. Das Pellet wurde mit je 500 µl HCl-Essigester wie oben nachextrahiert, die zusammengehörigen organischen Phasen vereinigt und unter einem Stickstoffstrom eingeengt. Die so erhaltenen Proben wurden quantitativ auf DC-Platten (Merck HPTLC Si 60, 10 x 10) aufgetragen und bei 4°C mit Benzol (30) : Dioxan (20) : Eisessig (1) in einer Sandwichkammer (Eigenbau) entwickelt. Die entwickelten Platten wurden mit 0,3 % Anisaldehyd, 2 % H_2SO_4 in Eisessig besprüht und zur Färbung 10 min bei 90°C erhitzt. Anschließend wurden die Platten autoradiographiert.

3.4.4. Versuch zur Hydrophoben Chromatographie

Für diese Versuche wurden aus 1 ml-Einmalspritzen kleine Säulen mit 1 ml Bettvolumen hergestellt. Die Säulen wurden mit Durchflußgeschwindigkeiten von 0,2 ml/h betrieben. Die Bindungstests wurden mit 1 mM bzw. 100 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 20 bzw. 50 % Glycerin und 0 bzw. 1 M $(NH_4)_2SO_4$ bei -20°C, +4°C und +10°C durchgeführt.

Die Tieftemperaturchromatographie wurde im Gefrierschrank durchgeführt. Die Elution der Enzyme erfolgte über eine Kombination folgender Methoden:

a) Herabsetzen der Ionenstärke,
b) Erhöhung der Glycerinkonzentration,
c) Senken der Temperatur.

Verwendete Chromatographie-Materialien:

Phenyl-Sepharoxe CL-4B, Octyl-Sepharose CL-4B. Bei beiden Gelen sind die Phenyl- bzw. Octylgruppen, 40 µmol/ml Bettvolumen, über Glyceryldiether als Spacer an die Sepharose gebunden.

3.4.5. Versuche zur Affinitätschromatographie

Für die Versuche zur Affinitätschromatographie wurden kleine Säulen aus 1 ml-Einmalspritzen mit je 0,5 ml Gelvolumen hergestellt. Die Säulen wurden mit Durchflußgeschwindigkeiten von 0,1 ml/h äquilibriert und betrieben. Die Bindungstests wurden mit je 20, 50 und 100 mM KP pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTE (nicht bei Thiopropyl-Sepharose 6B), 20 % - 50 % Glycerin durchgeführt. Für den Test wurden unterschiedlich saubere Enzymfraktionen eingesetzt.

Verwendete Affinitäts-Gele:

Blue-Sepharose CL-6B: Bei diesem Geltyp ist der Farbstoff Cibacron Blue F3G-A über die Triazin-Kopplungs-Methode (28), ca. 2 µmol/ml gequollenem Gel, an ein quervernetztes Agarose Gel gebunden.

NAD-Agarose AGNAD™ Typ 1: Das NAD, 1,0 - 5,0 µmol/ml Gel, ist nach der Methode von Moosbach (141) unspezifisch über einen Hexan-Spacer an die Agarose Matrix gebunden.

NAD-Agarose AGNAD™ Typ 3: Das NAD, 1,0 - 4,0 µmol/ml Gel, ist spezifisch mit einem 1,6-Hexandiamin-Spacer über C 8 des Adenins an die Agarose gebunden.

NAD-Agarose AGNAD™ Typ 4: Das NAD, 1,0 - 4,0 µmol/ml Gel, ist spezifisch mit einem Adipinsäuredihydrazid-Spacer über die Hydroxylgruppen der Ribose an die Agarose gebunden.

Thiopropyl-Sepharose 6B: Bei diesem Gel ist eine 2-Pyridyldisulfid-Gruppe, 20 µmol/ml gequollenem Gel, über einen 2-Hydroxypropyl-Spacer an die Sepharose gebunden (14).

3.4.6. Stabilität und Stabilisierung der NAD-15HPGDH

Unterschiedliche, während der Isolierungen anfallende Enzymfraktionen wurden jeweils über den Zeitraum eines Jahres auf die Veränderung ihrer enzymatischen Aktivität hin untersucht. Der mit der Zeit natürlicherweise auftretende Verlust an Enzymaktivität sollte über diese Versuchsreihe in Relation zu den Aufbewahrungsbedingungen gesetzt werden können (Proteinkonzentration der Probe, Aufbewahrungsmedium, Aufbewahrungstemperatur). Die jeweiligen Proben (siehe Tab. 6) wurden in verschließbaren Eppendorf-Hütchen bei $+4^{\circ}C$ und $-38^{\circ}C$ gelagert. Nach 5, 10 und 30 Tagen sowie nach 6 Monaten und einem Jahr wurde die verbleibende Enzymaktivität mit dem Standardtest (siehe 3.1.1.) gemessen.

Tab. 1: Für die Isolierungen von NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla verwendete Puffer.

Bezeichnung des Puffers	KP (mM)	EDTA (mM)	DTE (mM)	Glycerin (%, v/v)	pH
A	100	1	0,1	20	7,4
B	0	1	0,1	50	7,4
C	50	1	0,1	50	7,4
D	100	1	0,1	50	7,4

3.4.7. ISOLIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX

3.4.7.1. Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B

Gelabmessung: Ø 6 cm; V = 500 ml
Mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 60 ml/h wurde der 130 000 x g - Überstand der Cortex Präparation auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Da in dem Überstand während des Auftragens eine gallertige Masse ausfiel (keine Enzymaktivität), wurde die Säule durch eine vorgeschaltete Filterpatrone geschützt. Die Säule wurde nun mit 800 ml Puffer A gewaschen und anschließend mit einem linearen Gradienten, 500 g Puffer A → 500 g Puffer A + 1 M KCl eluiert. Die Fraktionen (5 ml) mit Enzymaktivität wurden zum Sepharose-Pool C vereinigt.

3.4.7.2. Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B

Gelabmessung: Ø 2 cm, 32 cm; V = 100 ml
Mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml/h wurde der DEAE-Sepharose-Pool C direkt auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 200 ml Puffer A und darauf folgend mit 200 ml Puffer B (1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 50 % Glycerin pH 7,4) nachgewaschen. Die Elution der NAD-15HPGDH erfolgte mit 100 ml Puffer B + 0,1 % Triton X-100. Fraktionsgröße: 5 ml. Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden zum Phenyl-Sepharose-Pool vereinigt.

3.4.7.3. Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B

Gelabmessung: Ø 2 cm, 28 cm; V = 90 ml
Der Phenyl-Sepharose-Pool C wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml/h auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen, anschließend wurde mit 100 ml Puffer A nachgewaschen. Eluiert wurde die NAD-15HPGDH mit einem linearen Gradienten, 70 g Puffer A → 70 g Puffer A + 1 M KCl. Fraktionsgröße: 5 ml. Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden zum Blue-Sepharose-Pool C vereinigt.

3.4.7.4. Chromatographie an Sephadex G-100

Gelabmessung: Ø 2,6 cm, 190 cm; V = 1000 ml
Der Blue-Sepharose-Pool C wurde über eine Probenschleife mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml/h auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Fraktionen des Eluats mit Enzymaktivität wurden zum Sephadex G-100 - Pool C vereinigt.

3.4.7.5. Chromatographie an NAD-Agarose AGNAD^{TM} Type 1

Gelabmessung: V = 2 ml (2 ml-Einmalspritze als Säule)
Mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/h wurde der Sephadex G-100 - Pool C auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen, anschließend wurde mit 6 ml Puffer D nachgewaschen. Eluiert wurde die NAD-15HPGDH mit 3 ml 4 mM NAD in Puffer D. Fraktionsgröße: 0,5 ml. Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden zum NAD-Agarose-Pool C vereinigt und bei -37^{o}C aufbewahrt.

3.4.8. ISOLIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-MEDULLA

3.4.8.1. Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B

Gelabmessung: Ø 2 cm, 28 cm; V = 90 ml
Mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/h wurde der 130 000 x g - Überstand der SN-Medulla Präparation auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen, anschließend wurde mit 200 ml Puffer A nachgewaschen. Die Elution der NAD-15HPGDH erfolgte über einen linearen Gradienten von 100 g Puffer A → 100 g Puffer A + 1 M KCl. Fraktionsgröße: 5 ml. Die Fraktionen mit NAD-15HPGDH-Aktivität wurden zum DEAE-Sepharose-Pool M vereinigt.

3.4.8.2. Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B

Gelabmessung: Ø 2 cm, 16 cm; V = 50 ml
Mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/h wurde der DEAE-Sepharose-Pool M auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 100 ml Puffer A, darauf folgend mit 100 ml Puffer C (50 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 50 % Glycerin) nachgewaschen. Die Elution der NAD-15HPGDH (SM) erfolgte über einen linearen, fallenden Gradienten, 50 g Puffer C, 50 g Puffer B (0 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 50 % Glycerin). Fraktionsgröße: 3 ml. Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden zum Phenyl-Sepharose-Pool M vereinigt.

3.4.8.3. Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B

Gelabmessung: V = 10 ml (10 ml Einmalspritze als Säule)
Mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ml/h wurde der Phenyl-Sepharose-Pool M auf die mit Puffer A äquilibrierte Säu-

le aufgetragen, anschließend wurde mit 20 ml Puffer A nachgewaschen. Eluiert wurde die NAD-15HPGDH mit einem linearen Gradienten von 10 g Puffer A → 10 g Puffer A + 1 M KCl. Fraktionsgröße 2 ml. Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden zum Blue-Sepharose-Pool M vereinigt.

3.4.8.4. Chromatographie an Sephadex G-100

Gelabmessung: Ø 2,6 cm, 95 cm; V = 500 ml
Der Blue-Sepharose-Pool M wurde über eine Probeschleife mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/h auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Fraktionsgröße: 5 ml. Die Fraktionen des Eluats mit Enzymaktivität wurden zum Sephadex G-100 - Pool M vereinigt.

3.8.4.5. Chromatographie an NAD-Agarose AGNAD^{TM} Type 1

Gelabmessung: V = 2 ml (2 ml Einmalspritze als Säule)
Mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/h wurde der Sephadex G-100 - Pool M auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen, anschließend wurde mit 6 ml Puffer D nachgewaschen. Eluiert wurde die NAD-15HPGDH mit 3 ml 4 mM NAD in Puffer D. Fraktionsgröße: 0,5 ml. Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden zum NAD-Agarose - Pool M vereinigt und bei -37^{o}C aufbewahrt.

3.4.9. Analytische Disk-Elektrophorese

Die analytischen Disk-Elektrophoresen wurden bei konstanter Spannung (300 V) unter Wasserkühlung in einer Flachgel- oder Röhrchengelapparatur von DESAGA durchgeführt. Die Gele

waren Modifikationen des Gelsystems 1a nach Maurer (137). Zur Frontmarkierung wurde Bromphenolblau verwendet. Die Proben enthielten 50 % Glycerin und wurden in Volumen zwischen 50 und 200 µl aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden mit den Gelen entweder eine Proteinanfärbung mit Coomassieblue (124) oder eine Aktivitätsanfärbung nach folgendem Schema, einer Modifikation der Methode von Schlegel et al. (189), durchgeführt.

Inkubationsansatz der Aktivitätsanfärbung:

Lösungen	Konzentration i. Ansatz (mM)
TRIS/HCl, pH 7,4 (37°C)	500
NAD	2
PGE_2	0,05
Nitroblautetrazoliumchlorid	0,2
Phenazinmethosulfat	0,16

Elektrophoretisiert wurden Proben aus folgenden Enzym-Pools: Phenyl-Sepharose Pool C und M, Blue-Sepharose-Pool C und M, NAD-Agarose-Pool C und M, außerdem eine hoch angereicherte NAD-15HPGDH aus Humanplacenta.

Zur Kontrolle der Aktivitätsanfärbung wurde ein Ansatz ohne PG gefahren.

Mit elektrophoretisierten Proben der DEAE-Sepharose-Pools C und M (200 µl) wurde eine Aktivitätsanfärbung mit NADP (2 mM i.A.) statt NAD durchgeführt.

3.4.10. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Das Molekulargewicht der beiden NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und -Medulla wurde nach der Methode von Andrews (6) durch Gelfiltration an Sephadex G-100 bestimmt (Gelabmessungen: Ø = 1,4 cm, h = 100 cm; Laufgeschwindigkeit: 5 ml/h; Puffer: 50 mM KP, pH 7,4, 1 mM DTE, 30 % Glycerin). In zwei getrennten Läufen wurden 97 mU des NAD-Pool-(SC) und 30 mU des NAD-Pool-(SM) in je 0,8 ml Gesamtvolumen über eine Probenschleife aufgetragen. Als Eichproteine wurden jeweils verwendet: 0,05 mg alkalische Phosphatase aus E.coli (MG 74 000), 3 mg Rinderserumalbumin (MG 67 000), 3 mg Ovalbumin (MG 45 000), 1 mg Myoglobin (MG 17 800) und 1 mg Cytochrom c aus Pferdeherz (MG 12 400). Die Molekulargewichte wurden der Arbeit von Andrews (6) entnommen. Die alkalische Phosphatase wurde nach Garen & Levinthal (75) gemessen. Die Albumine wurden über ihre Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (vgl. 3.3.), Myoglobin und Cytochrom c über ihre Extinktion bei 416 nm bestimmt.

3.4.11. Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch verschiedene Faktoren

Die Durchführung und Auswertung aller Messungen erfolgte nach 3.1.

Einflüsse von Zusätzen: Die Zusätze (Salze, Detergenz, EtOH, Glycerin, Inhibitoren, Aktivatoren, etc.) wurden mit Puffer, Cosubstrat (NAD, NADP) und Enzym 5 min bei 37°C vorinkubiert, dann wurde die Reaktion mit PG gestartet. Der pH des Testansatzes wurde stets auf pH 7,4 eingestellt.

pH-Abhängigkeit: Zur Messung der pH-Kurven wurde der pH im Ansatz selbst kontrolliert. Dies machte möglich, daß für die Messungen nur ein Puffersystem (TRAP) auch außerhalb seines

Pufferbereichs und ungeachtet seines Temperaturgangs verwendet werden konnte.

Temperaturabhängigkeit: Wie auch die anderen Messungen wurden die Messungen zur Temperaturabhängigkeit in einer thermostatisierbaren Küvettenautomatik durchgeführt. Bei jedem Wechsel der Temperatur wurde der Apparatur genügend Zeit gegeben, sich auf die neue Temperatur einzustellen. In einer Vergleichsküvette konnte die Temperatur kontrolliert werden. Der pH der unterschiedlichen Meßreihen wurde unter Berücksichtigung des Temperaturganges des Meßpuffers zwischen 20°C und 40°C konstant gehalten. Die Versuche wurden unter Substratsättigung durchgeführt. Die Arrhenius-Aktivierungsenergie (E_A = -logk·2,303 RT) des jeweiligen Enzyms wurde über die Steigung (St.) seiner Meßreihe im Arrhenius-Diagramm (log v gegen 1/K) ermittelt. Hierzu wurde die Geschwindigkeitskonstante k durch die Anfangsgeschwindigkeit v ersetzt. Da sich beide Variablen proportional zueinander verhalten, bleibt die Steigung im Arrhenius-Diagramm dabei unverändert (54). Es ergibt sich somit: E_A = -2,303 R·St.

3.4.12. Dünnschichtchromatographische Techniken

Reinheitskontrolle der PG

Die für die kinetischen Messungen verwendeten PG wurden routinemäßig einer Reinheitskontrolle unterzogen. Die PG wurden dazu in dem für den entsprechenden Versuch verwendeten Lösungsmittel auf DC-Platten (siehe unten) aufgetragen, unter einem Stickstoffstrom getrocknet, entwickelt und angefärbt (siehe unten).
Verwendete DC-Platten: Nano-Platten SIL-20 (5 x 5, 10 x 10, 20 x 20) von MACHERY, NAGEL & Co.; HPTLC Si 60-Platten (10 x 10) und HPTLC Si 60-Alufolien (20 x 20) von MERCK. Die Platten wurden mit und ohne Fluoreszenzindikator verwendet.

Lineare Dünnschichtchromatographien: Für diese Art der Chromatographie wurden die DC-Platten in einer Mikro-Sandwichkammer (Eigenbau) entwickelt.
Alle für die DC verwendeten Lösungsmittel waren von p.a.-Qualität. Vor ihrer Verwendung wurden die Lösungsmittel ausgiebig im Ultraschallbad entgast, dann erst zu den entsprechenden Mischungen vereinigt.

A) Einfache Entwicklung: Die DC-Platten wurden mit folgenden Fließmitteln in einer Mikro-Sandwichkammer (Eigenbau) entwickelt:

Benzol (20) : Dioxan (20) : Eisessig (1), $4^{o}C$
Benzol (30) : Dioxan (20) : Eisessig (1), $4^{o}C$
Diethylether (90) : Methanol (2) : Eisessig (0,1), $-40^{o}C$
Diethylether (85) : Petrolether 60/90 (15) : Eisessig (1), $-40^{o}C$

B) Entwicklung über Polaritätsstufen: Die DC-Platten wurden mit Chloroform (75) : Methanol (25) : H_2O (4) die ersten 10 % der Laufstrecke entwicklet, unter Stickstoff getrocknet, mit Chloroform (100) auf die Hälfte der Laufstrecke entwickelt, wieder unter Stickstoff getrocknet und mit Chloroform (25) : n-Hexan (75) über die volle Laufstrecke entwikkelt. Entwicklung bei $4^{o}C$.

Zirkulare Dünnschichtchromatographien: Die DC-Platten wurden in einen Prototyp des Circular-Dünnschichtchromatographen GLM 78 (10 x 10) mit einer Einrichtung für Laufmittelgradienten der Firma BERGHOF GmbH entwickelt.
A) Einfache Entwicklung: siehe lineare DC.
B) Gradienten Entwicklung: In der Mischkammer befanden sich 1,2 ml Chloroform (80) : Methanol (10) : H_2O (1) : Eisessig (1), in der Spritzenpumpe befanden sich 2 ml n-Hexan.
Anfärbung: Die Platten wurden entweder mit 10 %iger ethanolischer Phosphormolybdänsäurelösung (4) oder mit Anisaldehyd-Reagenz (121) angesprüht und bis zur deutlichen Farbentwicklung im Trockenschrank bei $110^{o}C$ bzw. $90^{o}C$ erhitzt.

Auftrennen von Reaktionsgemischen:

Die Reaktionsgemische enthielten PG, Nucleotid, die jeweilige Enzymfraktion und 100 mM TRAP, pH 7,4 ad 1 ml. Die Ansätze wurden mit dem PG gestartet, 20 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert und durch Zugabe des -40°C kalten Extraktionsmediums gestoppt.

Extraktion: Medium 1: HCl-Essigester, pH 3,5; Medium 2: Ethylether (30) : Methanol (4) : 0,2 M Citronensäure (1). Die Ansätze wurden mit je 1 ml Extraktionsmedium versetzt, 15 s gevortext, zentrifugiert, die organische Phase abpipettiert und die wäßrige Phase wie oben mit je 500 µl Extraktionsmedium nachextrahiert. Die entsprechenden organischen Phasen wurden vereinigt und unter dem Stickstoffstrom eingeengt.

Chromatographie: Die Extrakte wurden entweder auf HPTLC-Platten (10 x 10) aufgetragen und einer zirkularen DC (Gradientenentwicklung) unterworfen (4°C) oder auf Si 60 Platten mit Konzentrierungszone (20 x 20) von MERCK aufgetragen und mit einem der oben beschriebenen Systeme (4°C, -40°C) linear entwickelt.

Anfärbung: Mit Hilfe von Abdeckschablonen war es möglich, daß mehrfach aufgetragene gleiche Extrakte auf einer Platte unterschiedlich angefärbt werden konnten (Färbemethoden siehe oben). Die Färbemuster (UV-/Normallicht) wurden auf transparentes Zeichenpapier durchgepaust und so dokumentiert.

Wurden radioaktive Inkubationsansätze durchgeführt, so wurden die Platten anschließend an die Färbung einer Tieftemperaturautoradiographie (-40°C) unterzogen. Wenn erforderlich, wurden die so georteten Reaktionsprodukte ausgekratzt, eluiert (siehe oben) und in einem Szintillationszähler ausgezählt.

3.4.13. Untersuchung der Enzymfraktionen auf Fremdaktivitäten

Alkohol-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase wurden nach dem optischen Test von Bergmeyer (19) bestimmt. Zur Messung der 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurde im Standardtest (siehe 3.1.1.) PG durch 0,05 mM 17β-Estradiol ersetzt.

Zur Ermittlung der NAD-Reduktase- bzw. NADH-Oxidase-Aktivität wurden unter Standardtestbedingungen (siehe 3.1.1.) 1 mM NAD bzw. 0,1 mM NADH mit der jeweiligen Enzymfraktion gegen einen Leerwert ohne Enzym gemessen.

Zur Messung der NADP-abhängigen 15HPGDH-Aktivität wurde im Standardtest (siehe 3.1.1.) NAD durch 2 mM NADP ersetzt. Gegebenenfalls wurden zusätzlich Inkubationsansätze mit 1-^{14}C-PGE_2 und NADP (siehe 3.4.12.) durchgeführt und die Reaktionsgemische anschließend wie unter 3.4.12. beschrieben weiter aufgearbeitet.

Zur Bestimmung der NADPH-abhängigen 9KPG-Reduktase wurden unter Standardtestbedingungen 0,1 mM PGE_2 mit 0,2 mM NADPH inkubiert oder ein Inkubationsansatz mit 1-^{14}C-PGE_2 und 0,2 mM NADH durchgeführt.

Zur Ermittlung der NADH-abhängigen Δ^{13}-15KPGR-Reduktase wurde entweder im optischen Standardtest (siehe 3.1.1.) 0,1 mM 15KPGR mit 0,1 mM NADH inkubiert oder ein Inkubationsansatz mit ^{3}H-15KPGE_1 und 0,1 mM NADH durchgeführt.

3.4.14. Durchführung und Auswertung der kinetischen Messungen

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die kinetischen Messungen wie unter 3.1. beschrieben durchgeführt. Die Meßbedingungen sind in den Legenden zu den Tabellen und Abbildungen der jeweiligen Messungen aufgeführt. Die Anfangsgeschwindigkeiten (v) der einzelnen Reaktionen wurden wie unter 3.1. ermittelt und in nmol/min angegeben. In allen Fällen war die

Anfangsgeschwindigkeit über eine ausreichend lange Zeit konstant; Voraussetzung für Steady-State-Bedingungen nach Cleland (44). Aufgrund dieser Meßbedingungen wurden etwaige Folge- oder Rückreaktionen nicht berücksichtigt. Alle Meßreihen wurden graphisch manuell ausgewertet. Sie wurden dazu in folgenden linearisierenden Diagrammen aufgetragen:

Auftragung nach Lineweaver-Burk (130): (a) Primärdiagramm: 1/v gegen 1/[Substrat A oder B]. (b) Sekundärdiagramme: (1) Steigung (St.) der Geraden des Primärdiagramms gegen 1/[des konstanten Substrats] für Bisubstratkinetiken; Steigung der Geraden des Primärdiagramms gegen 1/[Inhibitor] für Hemmkinetiken. (2) Ordinatenabschnitte (Oa.) der Geraden des Primärdiagramms gegen 1/[des konstanten Substrats] für Bisubstratkinetiken; Ordinatenabschnitte des Primärdiagramms gegen 1/[Inhibitor] für Hemmkinetiken.

Auftragung nach Dixon (53,54): Bei dieser speziell für Hemmkinetiken entwickelten Auftragung wird 1/v gegen [Inhibitor] aufgetragen.

Auftragung nach Hanes (85): [A]/v gegen [A] bzw. [B]/v gegen [B].

Auftragung nach Eadie-Hoffstee (63,104): v gegen v/[A] bzw. v gegen v/[B].

Direkte lineare Auftragung (64): v wird auf der Ordinate, die Substratkonzentration auf der Abszisse abgetragen und beide Punkte über eine Gerade verbunden.

Die in dieser Arbeit wiedergegebenen kinetischen Konstanten sind Mittelwerte der aus den unterschiedlichen Auftragungen erhaltenen Werte. Stimmen die Aussagen der unterschiedlichen Diagramme bezüglich des kinetischen Verhaltens des jeweiligen Enzyms eindeutig überein, so ist der größeren Übersichtlichkeit halber nur das Lineweaver-Burk-Diagramm ge-

zeigt. Treten Abweichungen oder Besonderheiten von den in dieser Arbeit postulierten kinetischen Mechanismen auf, so ist zusätzlich das Diagramm gezeigt, das diesen Effekt am deutlichsten wiedergibt.

Die kinetischen Konstanten für Thionicotinamid-NAD (S-NAD) als Substrat der NAD-15HPGDH wurden über die Verfolgung der S-NADH-Bildung bei 398 nm ermittelt. Dabei wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 11,9 $cm^2/\mu Mol$ zugrundegelegt; Stein et al. (201). Die Konkurrenz von S-NAD mit der enzymatischen Reaktion zwischen NAD und PGE_2 wurde nach Rudolf & Fromm (179) bei 342 nm, dem isosbestischen Punkt für S-NAD/S-NADH, gemessen.

Die Auswertung der Diagramme erfolgte nach Cleland (41,42, 43,44), Fromm (73), Segel (190) und Bisswanger (24) unter Annahme eines Ordered Bi Bi Mechanismus mit NAD als führendem Substrat für die NAD-15HPGDH aus Schweineniere.

4. E R G E B N I S S E

4.1. Allgemeine Untersuchungen

4.1.1. Gewichtsverhältnis von Cortex zu Medulla

Die Gewichtsanteile von Cortex und Medulla weisen bei den präparierten Schweinenieren starke Schwankungen auf. Bei gleicher Art der Präparation ergaben sich C/M-Verhältnisse von ca. 6:1 bis ca. 11 : 1, das entspricht einem Unterschied von 46 %. Aus 16 Präparationen (62 Nieren) ergab sich ein mittleres Gewichtsverhältnis von Cortex/Medulla wie 8:1 (siehe dazu auch Tab. 2).

Tab. 2: Gewichtsverhältnis von Schweinenierencortex zu -Medulla in fünf ausgewählten Präparationen

Präparation	Cortex Gewicht (g) gesamt	Cortex Gewicht (g) pro N.	Medulla Gewicht (g) gesamt	Medulla Gewicht (g) pro N.	Gewichts-Verhältnis
1. 6 Nieren	720	120	106	17,7	6,8 : 1
2. 4 Nieren	688	172	68	17	10,1 : 1
3. 4 Nieren	448	112	60	15	7,5 : 1
4. 4 Nieren	476	119	72	18	6,6 : 1
5. 2 Nieren	224	112	28	14	8,0 : 1

4.1.2. NAD-15HPGDH-Aktivität in SN-Cortex und SN-Medulla

Die 62 während dieser Arbeit präparierten Nieren hatten in ihrem corticalen Gewebeanteil eine durchschnittliche NAD-15HPGDH-Aktivität von 10 000 mU/Niere (gemessen in den 130 000 x g - Überständen, Standardtestbdgn.), in ihrem medullären Anteil eine NAD-15HPGDH-Aktivität von durchschnittlich 160 mU/Niere. Die Werte wiesen jedoch Streuungen auf, die bei Cortex bis zu 40 %, bei Medulla bis zu 80 % betragen konnten. Auch das Verhältnis von NAD-15HPGDH-Aktivität in Cortex und Medulla, jeweils pro g Gewebe gerechnet, war nicht konstant. Es ergaben sich Werte von 4,5 : 1 bis 12,5 : 1, der Mittelwert lag bei 8,3 : 1 (siehe dazu Tab. 3).

Tab. 3: Verteilung der NAD-15HPGDH-Aktivität auf SN-Cortex und SN-Medulla in fünf ausgewählten Präparationen. Die NAD-15HPGDH-Aktivität wurde unter Standardtestbedingungen (siehe 3.1.1.) in den 130 000 x g - Überständen der jeweiligen Präparation gemessen. (A) Gesamtaktivität in mU, (B) Aktivität pro Niere in mU, (C) Aktivität pro g Gewebe in mU, (D) spezifische Aktivität in mU/mg Protein, (P) Präparation (siehe Tab. 2), (C/M) Verhältnis der Aktivitäten pro g Gewebe in Cortex zu denen in Medulla.

	Cortex				Medulla				
P	A	B	C	D	A	B	C	D	C/M
1	53496	8916	74,3	1,22	670	117	6,6	0,10	11,2:1
2	49398	12349	77,8	1,15	707	177	10,4	0,16	6,9:1
3	42720	10680	95,4	1,19	1152	288	19,2	0,24	5,0:1
4	41698	10424	78,6	1,18	526	132	7,3	0,13	10,8:1
5	19847	9923	88,6	1,21	328	164	11,7	0,18	7,6:1

4.1.3. Gütekontrolle der Kompartimenttrennung

Mit der unter 3.4.2. beschriebenen Methode konnte sichergestellt werden, daß eine Kontamination der Nierenkompartimente mit dem jeweiligen anderen Kompartiment für die nachfolgenden Untersuchungen keine Rolle spielen würde. Die gegenseitige Kontamination, gemessen in den 130 000 x g - Überständen, blieb meist deutlich unter 0,1 %. Über die Verluste der im Rahmen der Isolierung durchgeführten DEAE-Chromatographie (siehe 4.2.5.1. und 4.2.6.1.) wurden die Kontaminationen fast vollständig eliminiert. Eine endgültige Abtrennung geschah dann zwangsläufig über die nachfolgende Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B (siehe 4.2.5.2. und 4.2.6.2.).

4.2. ISOLIERUNG UND TEILWEISE CHARAKTERISIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX UND SN-MEDULLA

4.2.1. Einfluß von Ammoniumsulfatfällungen auf das chromatographische Verhalten von NAD-15HPGDH aus Schweineniere

Der unter 3.4.3. beschriebene Versuch brachte folgendes Ergebnis:

Wurden die 130 000 x g - Überstände der SN-Cortex und SN-Medulla Präparationen direkt auf DEAE-Sephadex A-50 Säulen aufgetragen, so konnte in dem Durchlauf der Säulen weder mit optischen Testmethoden (siehe 3.1.) noch mit Inkubationsansätzen mit NAD und 1-^{14}C-PGE_2 (siehe 3.4.3.; Abb. 3) NAD-15HPGDH-Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym wurde unter diesen Bedingungen (100 mM TRAP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 20 % Glycerin) quantitativ an das Säulenmaterial gebunden. Elutionsverhalten, Anreicherung und Verlust der NAD-15HPGDH während dieser Chromatographie entsprachen den

im Verlaufe der Isolierungen (siehe 4.2.5.1., 4.2.6.1.) an DEAE-Sepharose Cl-6B erhaltenen Ergebnissen (Tab. 4).

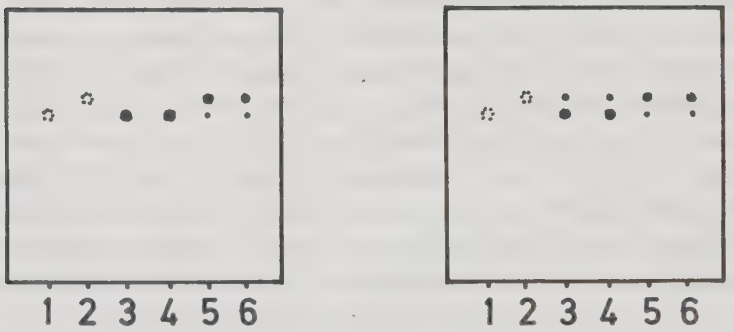


Abb. 3: Maßstabgerechte verkleinerte Darstellung der Dünnschichtchromatographien der Inkubationsansätze mit NAD und 1-^{14}C-PGE_2 zur Bestimmung des chromatographischen Verhaltens von NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla an DEAE-Sephadex A-50. (A) Aufarbeitung ohne, (B) mit vorangegangener Ammoniumsulfatfällung. (1) PGE_2, (2) 15-Keto-PGE_2, (3,4) Durchlauf der DEAE-Sephadex A-50 Säule, SN-Cortex bzw. SN-Medulla, (5,6) Eluat der DEAE-Sephadex A-50 Säule, SN-Cortex bzw. SN-Medulla.

Wurden die 130 000 x g - Überstände der SN-Cortex bzw. SN-Medulla Präparationen erst einer Ammoniumsulfatfällung (anschließende Dialyse der Präzipitate gegen Puffer A, siehe 3.4.3.) unterzogen und dann erst auf DEAE-Sephadex A-50 Säulen aufgetragen, so ergab sich ein verändertes chromatographisches Verhalten der NAD-15HPGDH beider Kompartimente. Mehrere Prozent der in den jeweiligen Dialysaten gemessenen NAD-15HPGDH-Aktivität befanden sich im Durchlauf der jeweiligen Säule (Abb. 3, Tab. 4). Trotz obigem Versuch identischer chromatographischer Bedingungen wurde die NAD-15HPGDH nach dieser Behandlung nicht mehr quantitativ an das Gelmaterial gebunden. Die Ammoniumsulfatfällung brachte, bezogen auf die 130 000 x g - Überstände, einen ca. 20 %igen Verlust an NAD-15HPGDH-Aktivität. Die Elution des Enzyms erfolgte erst bei höheren Salzkonzentrationen (Tab. 4), d.h. das Elu-

tionsverhalten der NAD-15HPGDH wurde durch die Ammoniumsulfatfällung verändert.

Tab. 4: Einfluß von Ammoniumsulfatfällungen (ASF) auf das chromatographische Verhalten von NAD-15HPGDH aus Schweinenierencortex (SC) und -medulla (SM) gegenüber DEAE-Sephadex A-50 (DEAE). Versuchsbedingungen siehe 3.4.3.

Aufarbeitung	Homogenisation 130000 x g - Ü - DEAE-Chrom.		Homogenisation 130000 x g - Ü ASF, Dialyse DEAE-Chrom.	
	SC	SM	SC	SM
NAD-15HPGDH-Aktivität (mU)				
130000xg-Überstand	5124	508	5205	514
Dialysat nach ASF	-	-	4098	428
Durchlauf der DEAE	0	0	112	22
Eluat der DEAE	4463	432	3507	376
Anreicherung (n-fach)				
gesamt	42	38	16	17
an DEAE-Sephadex	42	38	8	8
max. Elution bei (mM KCl)	350	350	420	450

4.2.2. Versuche zur Hydrophoben Chromatographie

Die in dieser Arbeit untersuchten NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla wie auch aus Humanplacenta zeigten hydrophobe Eigenschaften. Die relative Stärke der hydrophoben Wechselwirkungen dieser Enzyme mit Phenyl-Sepharose Cl-4B unter unterschiedlichen Bedingungen ist in Tab. 5 zusammengefaßt.

Tab. 5: Bindungsverhalten von NAD-15HPGDH unterschiedlicher Gewebe gegenüber dem hydrophoben Gel Phenyl-Sepharose Cl-4B. Die hier verwendeten Enzymfraktionen sind zu keinem Zeitpunkt der Aufarbeitung einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen worden. (SC) Schweineniere-Cortex, (SM) Schweineniere-Medulla, (Hu) Humanplacenta. (++) vollständige, (+) teilweise, (-) keine Bindung an das hydrophobe Gel.

KP (mM)	Glycerin (%, v/v)	Triton X-100 (%, v/v)	t (^{o}C)	Bindungsverhalten der NAD-15HPGDH (SC)	(SM)	(Hu)
100	20		+ 4	++	++	++
100	20	0,1	+10	++	++	++
100	20	0,1	+ 4	+	+	+
1	20		+10	++	++	++
1	20		+ 4	++	++	++
1	20	0,1	+ 4	-	-	-
1	20		-10	+	-	-
1	50		+10	++	+	+
1	50	0,1	+10	-	-	-
1	50		+ 4	+	-	-
1	50		-20	-	-	-

Die Enzyme banden umso fester an das Gel, je höher die Ionenstärke, je geringer die Glycerinkonzentration und je höher die Temperatur war. Eine Elution der Enzyme war nur dann möglich, wenn mindestens zwei dieser Parameter entsprechend verändert wurden, d.h. niedrige Ionenstärke, hohe Glycerinkonzentration, niedrige Temperatur. Die NAD-15HPGDH aus SN-Medulla verhielt sich wie die aus Humanplacenta, die aus SN-Cortex band fester. Wurden die Enzymfraktionen vor ihrem Auftrag einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen oder direkt mit hohen Ammoniumsulfatkonzentrationen (2 M) aufgetragen, so waren die hydrophoben Wechselwirkungen anschließend generell schwieriger zu lösen, die NAD-15HPGDH-(SC) z.B. bei 1 mM KP, 50 % Glycerin, 4^{o}C nur noch mit 1 % Troton X-100).

Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den obigen Enzymen und Octyl-Sepharose Cl-4B waren so stark, daß sie unter allen beschriebenen Bedingungen nur mit Detergenz zu lösen waren.

4.2.3. Versuche zur Affinitätschromatographie

Die NAD-15HPGDH aus SN-Cortex wie auch aus SN-Medulla verhielten sich gegenüber den an ihnen ausprobierten Affinitätschromatographie-Materialien gleichartig.

Blue-Sepharose Cl-6B: Bis 100 mM KP, pH 7,4, 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTE wurden beide Enzyme quantitativ an Blue-Sepharose Cl-6B gebunden. Eluiert werden konnten die Enzyme entweder über Salzgradienten (bei 100 mM KP ab 100 mM KCl oder NaCl) oder mit NAD (5 mM). Der Verlust an Enzymaktivität war, abhängig von dem Proteingehalt der eingesetzten Enzymfraktionen, zwischen 10 % und 28 %.

NAD-Agarose (AGNAD^{TM} Type 1): An dieses Gelmaterial mit unbekannter NAD-Bindungsstelle (Kopplung nach Moosbach (141)) wurden beide Enzyme bei 20 - 100 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTE, 20 - 50 % Glycerin quantitativ gebunden. Eluiert werden konnten die Enzyme entweder über Salzgradienten (oberhalb 200 mM KCl, bei 100 mM KP) oder mit NAD (4 mM).

NAD-Agarose (AGNAD^{TM} Type 3): Unter keiner der in 3.4.5. beschriebenen Bedingungen band eines der Enzyme an dieses Gelmaterial.

NAD-Agarose (AGNAD^{TM} Type 4): Auch mit diesem Gelmaterial konnte keine Bindung der Enzyme erzielt werden.

Thiopropyl-Sepharose 6B: Unter den in 3.4.5. beschriebenen Bedingungen banden beide Enzyme quantitativ an dieses Gelmaterial und konnten mit 0,5 mM DTE oder 10 mM ME wieder eluiert werden. Die Verluste an Enzymaktivität bei dieser Chromatographie waren teilweise sehr hoch (bis zu 55 %), sind wohl jedoch großteils der Abwesenheit der Thiole zuzuschreiben.

4.2.4. Stabilität und Stabilisierung der NAD-15HPGDH

Beide Enzyme verhielten sich bezüglich ihrer Stabilität und bezüglich der Möglichkeiten ihrer Stabilisierung im Rahmen der experimentellen Abweichungen gleich. Abhängig vom Proteingehalt der Lösung traten bei geringer Glycerin- und Salzkonzentration (< 20 %, v/v bzw. < 20 mM KP) bei 2 - 4°C schon nach wenigen Tagen erhebliche Verluste an Enzymaktivität auf (Tab. 6). Die Verluste waren wesentlich geringer bei hohen Ammoniumsulfatkonzentrationen, wie sie nach Fällungen vorlagen. Während der Fällungen selbst traten jedoch immer erhebliche Verluste auf.

Auch höhere NAD-Konzentrationen hatten einen eindeutig stabilisierenden Effekt, was sich besonders bei den äußerst geringen Proteinkonzentrationen, wie sie nach den NAD-Agarose Chromatographien auftraten, positiv auswirkte. Interessant war, daß sich die stabilisierenden Effekte von Glycerin und NAD additiv verhielten. Zusammen mit anderen Beobachtungen läßt dies vermuten, daß Glycerin und NAD das Enzym über jeweils unterschiedliche Mechanismen schützen. Durch Oxidation auftretende Aktivitätsverluste konnten durch Zusatz von DTE oder ME weitgehend regeneriert werden. Bei -38°C waren die Enzymfraktionen in 20 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 50 % Glycerin, abhängig von der Proteinkonzentration, hinlänglich stabil (Tab. 6).

Tab. 6: Stabilität und Stabilisierung der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla. Werden keine anderen Angaben gemacht, so wurde der Stabilitätstest in 20 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTE, 20 % Glycerin durchgeführt. (d) Tage, (a) Jahre.

NAD-15HPGDH aus	Protein (mg/ml)	t (°C)	Pufferänderungen und Zusätze (+), (-)	Aktivitätsverlust in % nach 5 d	10 d	30 d	0,5 a	1 a
(SC)	2	+4		8	13	30	87	100
(SM)	2	+4		10	15	31	92	100
(SC)	0,2	+4		35	64	100	-	-
(SM)	0,2	+4		38	64	100	-	-
(SC)	2	+4	+ 60 % $(NH_4)_2SO_4$	2	5	12	32	83
(SM)	2	+4		2	6	13	33	79
(SC)	2	+4	- Glycerin, - ME	80	100	-	-	-
(SM)	2	+4		83	100	-	-	-
(SC)	0,2	+4	+ 0,5 mM NAD	3	16	63	74	87
(SM)	0,2	+4		4	17	63	72	85
(SC)	2	-38	50 % Glycerin	0	0	0	0	2
(SM)	2	-38		0	0	0	0	2
(SC)	0,2	-38	50 % Glycerin	0	0	2	8	22
(SM)	0,2	-38		0	0	2	9	20
(SC)	0,02	-38	50 % Glycerin	0	0	5	15	38
(SM)	0,02	-38		0	0	6	17	40
(SC)	0,02	-38	50 % Glycerin	0	0	0	7	20
(SM)	0,02	-38	+ 0,5 mM NAD	0	0	0	7	21
(SC)	0,02	-38	50 % Glycerin	0	0	0	10	25
(SM)	0,02	-38	+ 0,1 % Triton X-100	0	0	0	9	23

4.2.5. ISOLIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX

4.2.5.1. Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B

Die NAD-15HPGDH wurde quantitativ an das Säulenmaterial gebunden. Die Elution des Enzyms begann bei 100 mM KCl in Puffer A, war bei ca. 350 mM KCl maximal und endete bei etwa 600 mM KCl (Abb. 4). Der DEAE-Sepharose-Pool-C hatte eine Gesamtaktivität von 51975 mU und eine spez. Aktivität von 52.8 mU/mg Protein. Bezogen auf den 130 000 x g - Überstand war die Anreicherung bei diesem Chromatographieschritt 44,4-fach. Der Verlust an dieser Säule konnte nicht berechnet werden, da die NAD-15HPGDH-Aktivität nach dieser Chromatographie, aufgrund der nun günstigeren Testbedingungen, anstieg.

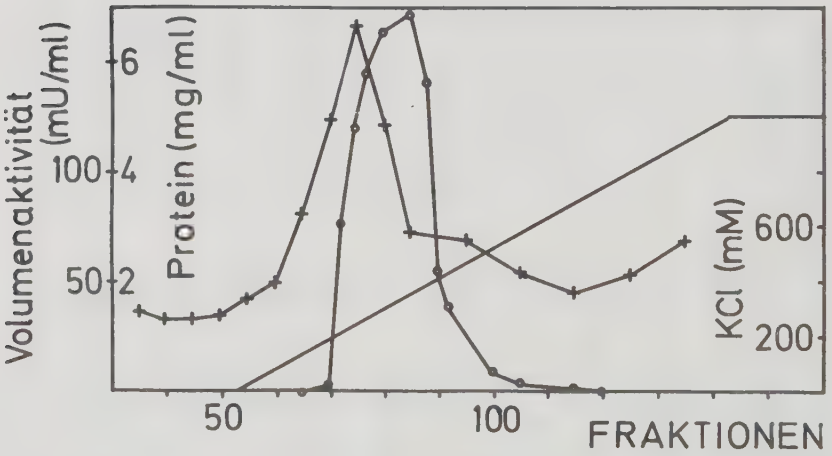


Abb. 4: Elutionsdiagramm der DEAE-Sepharose Cl-6B Chromatographie mit NAD-15HPGDH-(SC). Einzelheiten siehe 3.4.7.1. +——+ Proteinkonzentration (A_{260}/A_{280}), o——o Volumenaktivität der 15HPGDH (Standardtest), ——— KCl-Konzentration.

4.2.5.2. Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B

Im Durchlauf und in den Waschstufen der Phenyl-Sepharose Säule befand sich keine NAD-15HPGDH-Aktivität, d.h. das Enzym wurde quantitativ an das Säulenmaterial gebunden (Abb. 5). Der Phenyl-Sepharose-Pool-C hatte eine Gesamtaktivität von 35863 mU und eine spez. Aktivität von 221,8 mU/mg Protein. Die Anreicherung dieses Chromatographieschrittes war, bezogen auf den DEAE-Sepharose-Pool-C, 4,2-fach. Der Verlust an NAD-15HPGDH-Aktivität auf dieser Säule betrug 31 %.

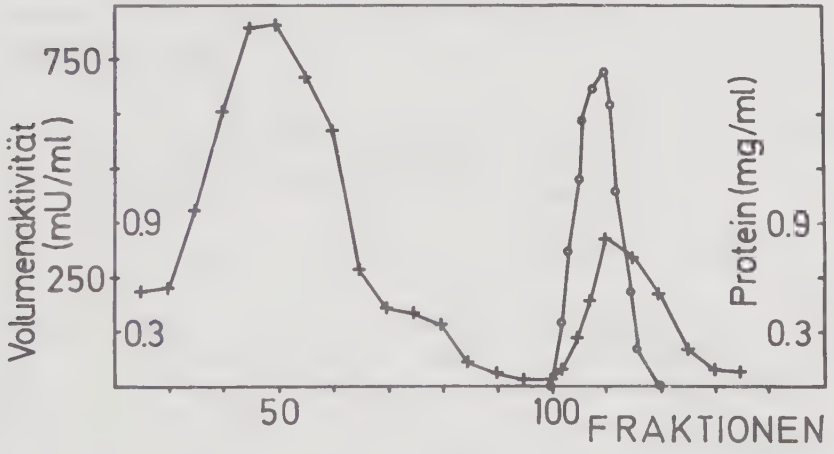


Abb. 5: Elutionsdiagramm der Phenyl-Sepharose Cl-4B Chromatographie mit NAD-15HPGDH-(SC). Einzelheiten siehe 3.4.7.2. +——+ Proteinkonzentration (A_{260}/A_{280}), o——o Volumenaktivität der 15HPGDH (Standardtest).

4.2.5.3. Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B

Die NAD-15HPGDH wurde quantitativ an das Säulenmaterial gebunden. Die Elution des Enzyms begann bei Puffer A + ca. 100 mM KCl, war bei ca. 225 mM KCl maximal und endete bei ca. 380 mM KCl (Abb. 6). Der Blue-Sepharose-Pool-C hatte

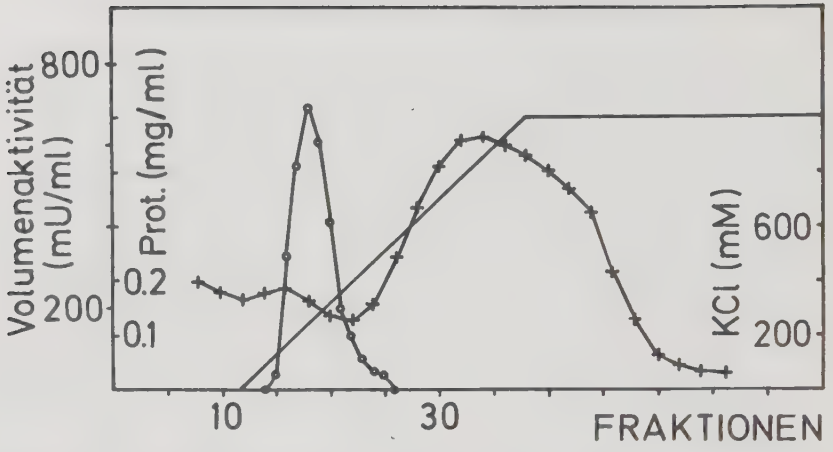


Abb. 6: Elutionsdiagramm der Blue-Sepharose Cl-6B Chromatographie mit NAD-15HPGDH-(SC). Einzelheiten siehe 3.4.7.3. +——+ Proteinkonzentration (A_{260}/A_{280}), o——o Volumenaktivität der 15HPGDH (Standardtest), ——— KCl-Konzentration.

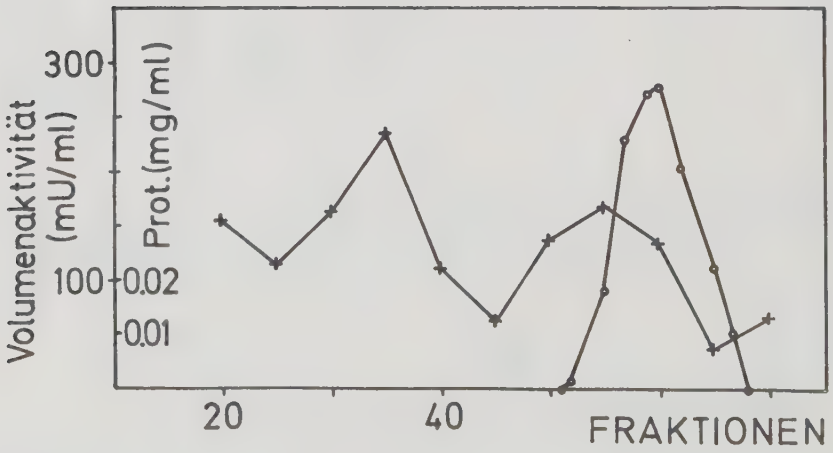


Abb. 7: Elutionsdiagramm der Sephadex G-100 Chromatographie mit NAD-15HPGDH-(SC). Einzelheiten siehe 3.4.7.4. +——+ Proteinkonzentration (A_{260}/A_{280}). o——o Volumenaktivität (Standardtest).

eine Gesamtaktivität von 27256 mU und eine spez. Aktivität von 27725 mU/mg Protein. Bezogen auf den Phenyl-Sepharose-Pool-C war die Anreicherung bei diesem Chromatographieschritt 125-fach. Der Verlust an NAD-15HPGDH-Aktivität war 24 %.

4.2.5.4. Chromatographie an Sephadex G-100

Der Sephadex G-100-Pool-C hatte eine Gesamtaktivität von 18534 mU und eine spez. Aktivität von 38815 mU/mg Protein. Die Anreicherung bei dieser Chromatographie war, bezogen auf den Blue-Sepharoxe-Pool-C, 1,4-fach, der Verlust an NAD-15HPGDH-Aktivität war 32 % (Abb. 7).

4.2.5.5. Chromatographie an NAD-Agarose AGNAD^{TM} Type 1

Die NAD-15HPGDH-(SC) band vollständig an dieses Gelmaterial. Die Elution mit 4 mM NAD war quantitativ. Der NAD-Agarose-Pool-C hatte eine Gesamtaktivität von 6822 mU und eine spez. Aktivität von 710625 mU/mg Protein. Bei einem Aktivitätsverlust von 63 % war die Anreicherung gegenüber dem Sephadex G-100-Pool-C 18-fach.

Die einzelnen Schritte der Isolierung sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: Isolierung einer NAD-15HPGDH aus SN-Cortex. Die Enzymaktivitäten basieren auf dem Standardtest (siehe 3.1.1.), 1 mU entspricht der Bildung von 1 nmol NADH/min. Proteinkonzentrationen wurden nach 3.3. mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt.

Enzymfraktion	Protein gesamt (mg)	(mg/ml)	Enzymaktivität gesamt (mU)	(mU/ml)	(mU/mg Protein)	Ausbeute (%)	Anreicherung (n-fach)
130 000 x g - Überstand-C	35901	26,5	42720	31,5	1,19	100	1
DEAE-Sepharose-Pool-C	984	2,4	51075	126,8	52,8	122	44,4
Phenyl-Sepharose-Pool-C	161,7	1,9	35863+	421,9+	221,8	84	186,5
Blue-Sepharoxe-Pool-C	0,98	0,018	27265	495,6	27725	64	23312,5
Sephadex G-100-Pool-C	0,48	0,003	18534	115,6	38815	43	32637,5
NAD-Agarose-Pool-C	0,0096	0,0012	6822	852,8	710625	16	587475

+) dieser Wert wurde entsprechend dem Triton-Effekt (siehe 4.7.) korrigiert.

4.2.6. ISOLIERUNG EINER NAD-15HPGDH AUS SN-MEDULLA

4.2.6.1. Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B

Die NAD-15HPGDH-(SM) band vollständig an das Säulenmaterial. Die Gradientenelution erfolgte analog der bei Cortex beschriebenen (Abb. 8). Der DEAE-Sepharose-Pool-M hatte eine Gesamtaktivität von 981 mU und eine spez. Aktivität von 9,13 mU/mg Protein. Die Anreicherung der NAD-15HPGDH-(SM) war bei diesem Chromatographieschritt, bezogen auf den 130 000 x g - Überstand, 38-fach. Der Verlust an Enzymaktivität betrug mindestens 15 %. Auch hier muß davon ausgegangen werden, daß, wie bei Cortex, die Enzymaktivität im 130 000 x g - Überstand, aufgrund der ungünstigeren Testbedingungen, zu niedrig angesetzt wurde.

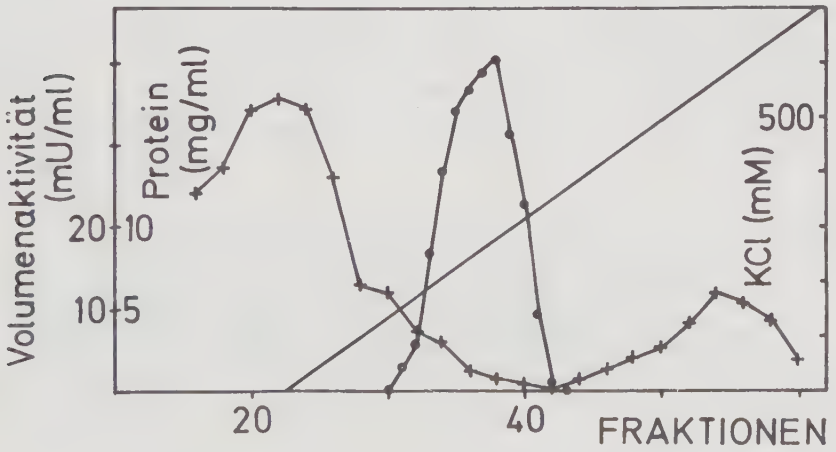


Abb. 8: Elutionsdiagramm der DEAE-Sepharose Cl-6B Chromatographie mit NAD-15HPGDH-(SM). Einzelheiten siehe 3.4.8.1. +——+ Proteinkonzentration (A_{260}/A_{280}), o——o Volumenaktivität der 15HPGDH (Standardtest), ——— KCl-Konzentration.

4.2.6.2. Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B

Die NAD-15HPGDH-(SM) wurde vollständig an das Säulenmaterial gebunden und konnte zwischen 2 - 0 mM KP bei 50 % Glycerin eluiert werden (Abb. 9). Der Phenyl-Sepharose-Pool-M hatte eine Gesamtaktivität von 627 mU und eine spez. Aktivität von 30,1 mU/mg Protein. Die Anreicherung, bezogen auf den DEAE-Sepharose-Pool-M, war bei dieser Chromatographie 3,2-fach. Der Verlust an 15HPGDH-Aktivität auf dieser Säule betrug 36 %.

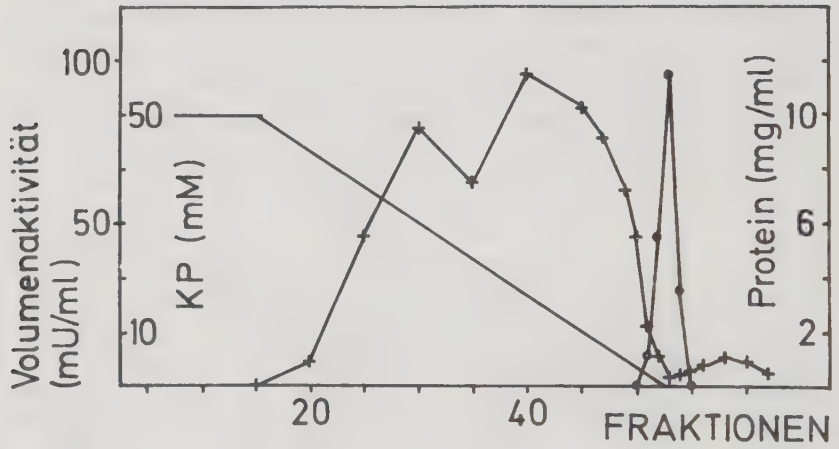


Abb. 9: Elutionsdiagramm der Phenyl-Sepharose Cl-4B Chromatographie mit NAD-15HPGDH-(SM). Einzelheiten siehe 3.4.8.2. +——+ Proteinkonzentration (A_{260}/A_{280}), o——o Volumenaktivität der 15HPGDH (Standardtest), ——— Kaliumphosphat-Konzentration.

4.2.6.3. Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B

Die NAD-15HPGDH-(SM) wurde quantitativ an das Säulenmaterial gebunden. Die Elution mit KCl erfolgte wie bei Cortex beschrieben (Abb. 10). Der Blue-Sepharose-Pool-M hatte eine Gesamtaktivität von 508 mU und eine spez. Aktivität von

24983,3 mU/mg Protein. Die Anreicherung der 15HPGDH, bezogen auf den Phenyl-Sepharose-Pool-M, war bei dieser Chromatographie 83-fach, der Verlust an Enzymaktivität betrug 19 %.

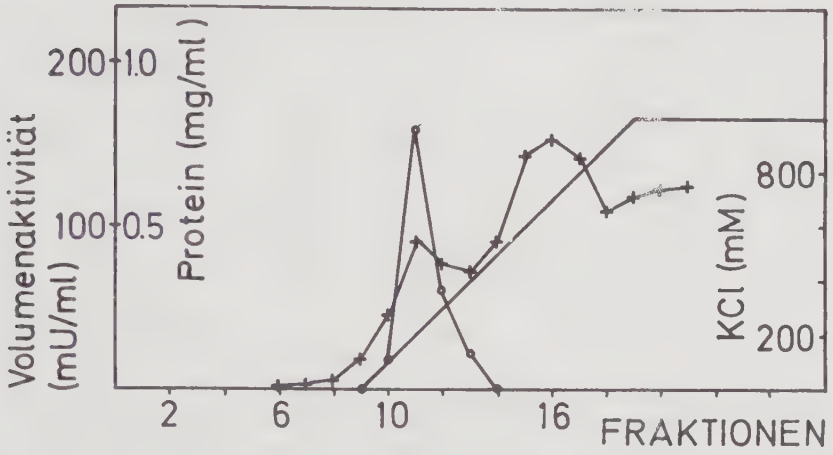


Abb. 10: Elutionsdiagramm der Blue-Sepharose Cl-6B Chromatographie mit NAD-15HPGDH-(SM). Einzelheiten siehe 3.4.8.3. +——+ Proteinkonzentration (A_{260}/A_{280}), o——o Volumenaktivität der 15HPGDH (Standardtest), ——— KCl-Konzentration.

4.2.6.4. Chromatographie an Sephadex G-100

Der Sephadex G-100-Pool-M hatte eine Gesamtaktivität von 188 mU und eine spez. Aktivität von 4496,9 mU/mg Protein. Die Anreicherung war, bezogen auf den Blue-Sepharose-Pool-M, 1,8-fach, der Verlust an NAD-15HPGDH-Aktivität war 63 % (Abb. 11).

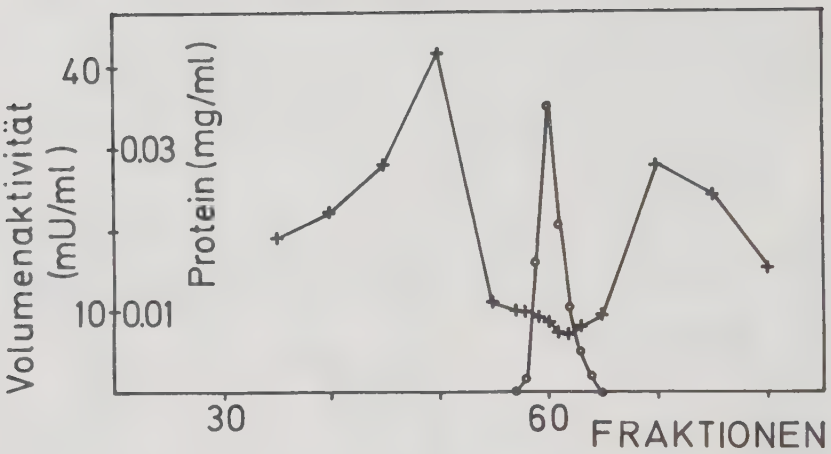


Abb. 11: Elutionsdiagramm der Sephadex G-100 Chromatographie mit NAD-15HPGDH-(SM). Einzelheiten siehe 3.4.8.4. +——+ Proteinkonzentration (Amidoschwarz-Methode, siehe 3.3.), O——o Volumenaktivität (Standardtest).

4.2.6.5. Chromatographie an NAD-Agarose AGNAD^{TM} Type 1

Die NAD-15HPGDH-(SM) wurde vollständig an das Gel gebunden und konnte mit 4 mM NAD eluiert werden. Die Gesamtaktivität im NAD-Agarose-Pool M betrug 120,6 mU. Die spez. Aktivität kann, da aufgrund der geringen Probenmenge und der sehr geringen Proteinkonzentration darin keine exakte Proteinbestimmung mehr durchgeführt werden konnte, nur als Mindestwert angegeben werden. Setzt man die Proteinkonzentration gleich 1 µg/ml (dies entspricht der Proteinkonzentration, die bei 500 µl Probe noch nachgewiesen werden kann, siehe 3.3.), so ergibt sich eine spez. Aktivität von 121 000 mU/mg Protein. Die Anreicherung, bezogen auf den Sephadex G-100-Pool-M, war bei dieser Chromatographie mindestens 27-fach, der Verlust an Enzymaktivität betrug 36 %.
Die einzelnen Schritte dieser Isolierung sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Tab. 8: Isolierung einer NAD-15HPGDH aus SN-Medulla. Die Enzymaktivitäten basieren auf dem Standardtest (3.1.1.). 1 mU entspricht der Bildung von 1 nmol NADH/min. Proteinkonzentrationen wurden nach 3.3. mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. Die Proteinkonzentration und damit auch die spez. Aktivität im NAD-Agarose-Pool-M sind als Maximal- bzw. Minimalwerte zu verstehen, da in der geringen Probenmenge keine gesicherte Proteinbestimmung mehr möglich war. Die Proteinkonzentration in diesem Pool wurde willkürlich gleich 1 µg gesetzt, das entspricht der minimalen Proteinkonzentration, die mit 500 µl Probe noch gesichert festgestellt werden kann. Die tatsächliche Proteinkonzentration war jedoch wesentlich geringer.

Enzymfraktion	Protein		Enzymaktivität			Ausbeute	Anreicherung
	gesamt (mg)	(mg/ml)	gesamt (mU)	(mU/ml)	(mU/mg Protein	(%)	(n-fach)
130 000 x g - Überstand-M	4833,2	17,2	1152	4,1	0,24	100	1
DEAE-Sepharose-Pool-M	107,3	1,95	981	17,8	9,13	85	38
Phenyl-Sepharose-Pool-M	20,8	1,73	627	52,3	30,1	54,4	121,6
Blue-Sepharose-Pool-M	0,203	0,025	508	63,5	2498,3	44,1	10092,8
Sephadex G-100-Pool-M	0,042	0,0012	188	5,4	4496,9	16,1	18167
NAD-Agarose-Pool-M	<0,001	<0,001	121	80,4	>121000	10,4	488827

4.3. Analytische Disk-Elektrophoresen

Alle Disk-Elektrophoresen (Flachgel-, Röhrchengelelektrophorese, 7 %ige, 9,8 %ige Gele) zeigten gleichartige Ergebnisse. Erst in den am höchsten gereinigten Fraktionen der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und -Medulla, den NAD-Agarose-Pools, konnten keine Proteinbanden mehr ausgemacht werden. Alle untersuchten Enzymfraktionen zeigten in der Aktivitätsanfärbung mit NAD und PGE_2 nur eine Bande, die mit der von NAD-15HPGDH aus Humanplacenta korrespondierte. Die Kontrollanfärbung ohne PG ("nothing dehydrogenase" (74)) zeigte ein davon verschiedenes Verhalten. Die DEAE-Sepharose-Pools beider Präparationen zeigten im Inkubationsansatz mit NADP und PGE_2 keine Aktivitätsbande. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

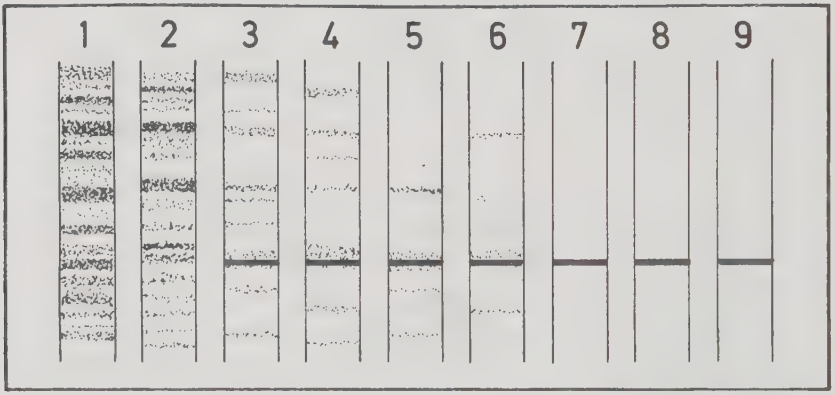


Abb. 12: Schematische Skizze der analytischen Disk-Elektrophoresen mit unterschiedlichen Fraktionen der Isolierungen einer NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und -Medulla. Wiedergegeben ist ein Elektrophoreselauf in einer Röhrchengelapparatur mit 7 %igem Trenngel (pH 8,5). Proteinanfärbung (gepunktet; Färbetechnik siehe 3.4.9.) und Aktivitätsanfärbung (gestrichen; Färbetechnik siehe 3.4.9.) sind übereinander projeziert. Das Verhältnis der Abstände der Protein- und Aktivitätsbanden zueinander ist maßstabgerecht. (1,2) DEAE-Sepharose-Pool-(C) bzw. -(M), Inkubationsansatz mit NADP statt NAD, (3,4) Phenyl-Sepharose-Pool-(C) bzw. -(M), (5,6) Blue-Sepharose-Pool (C) bzw. -(M), (7,8) NAD-Agarose-Pool-(C) bzw. -(M), (9) NAD-Agarose-Pool einer NAD-15HPGDH Isolierung aus Humanplacenta.

4.4. Bestimmung des Molekulargewichts der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla durch Gelfiltration an Sephadex G-100

Unter den in 3.4.10. beschriebenen Versuchsbedingungen wurde für die NAD-15HPGDH aus SN-Cortex durch Gelfiltration an Sephadex G-100 ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 51 000 ermittelt, für die NAD-15HPGDH aus SN-Medulla ergab sich ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 50 000 (Abb. 13).

4.5. pH-Abhängigkeit

Die pH-Abhängigkeit der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex, wie auch die der aus SN-Medulla, zeigen unter den unter 3.4.11. angegebenen Meßbedingungen einen prinzipiell gleichen Verlauf (Abb. 14). Beide Kurven zeigen ein ausgeprägtes Plateau zwischen pH 7 und pH 7,9 und ein hohes Maximum bei pH 9,4 bzw. pH 9,6. Das Verhältnis von Plateauhöhe zu Peakhöhe beträgt für die NAD-15HPGDH-(SC) 1 : 1,97, für die NAD-15HPGDH-(SM) 1 : 2,21.

4.6. Temperaturabhängigkeit

Unter den unter 3.4.11. angegebenen Meßbedingungen zeigt die Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC), wie auch die der NAD-15HPGDH-(SM), im Arrhenius-Diagramm für den Temperaturbereich von 20°C bis 40°C eine lineare Beziehung (Abb. 15). Bei Verwendung der Substrate NAD und PGE_2 errechnet sich für die NAD-15HPGDH-(SC) eine Aktivierungsenergie (E_A) von 57,26 kJ/Mol (13,68 kcal/Mol), für die NAD-15HPGDH-(SM) eine Aktivierungsenergie von 56,69 kJ/Mol (13,54 kcal/Mol).

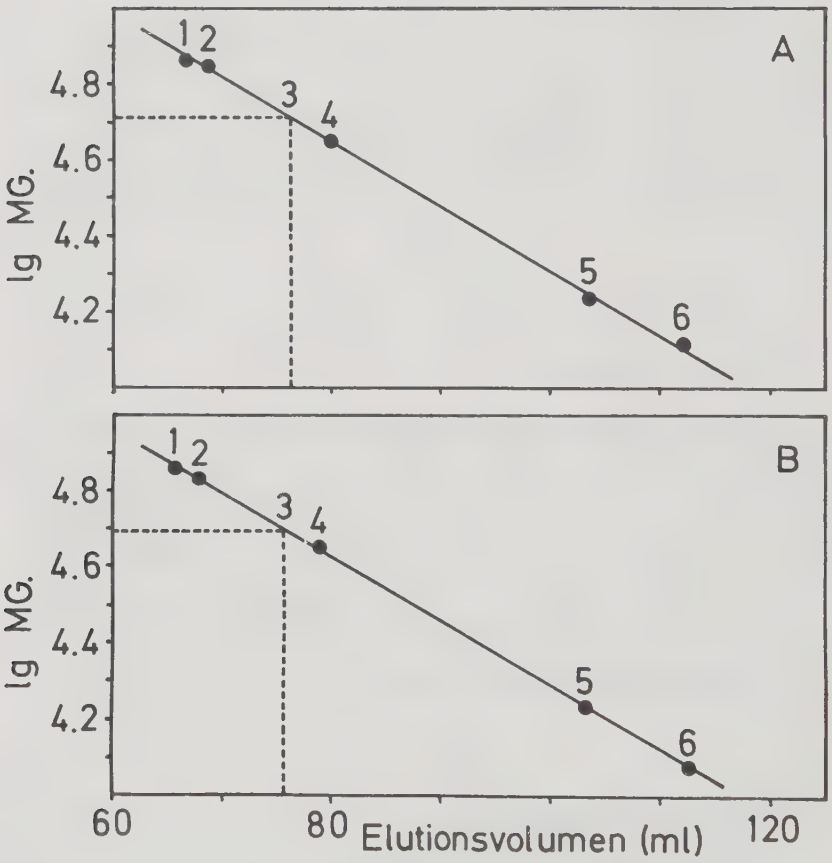


Abb. 13: Molekulargewichtsbestimmung (A) der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und (B) der NAD-15HPGDH aus SN-Medulla durch Gelfiltration über Sephadex G-100. Einzelheiten siehe 3.4.10. Eichproteine: (1) Alkalische Phosphatase aus E. coli, (2) Rinderserumalbumin, (4) Ovalbumin, (5) Myoglobin, (6) Cytochrom c, (3) NAD-15HPGDH-(SC) bzw. -(SM) aus den jeweiligen NAD-Agarose-Pools.

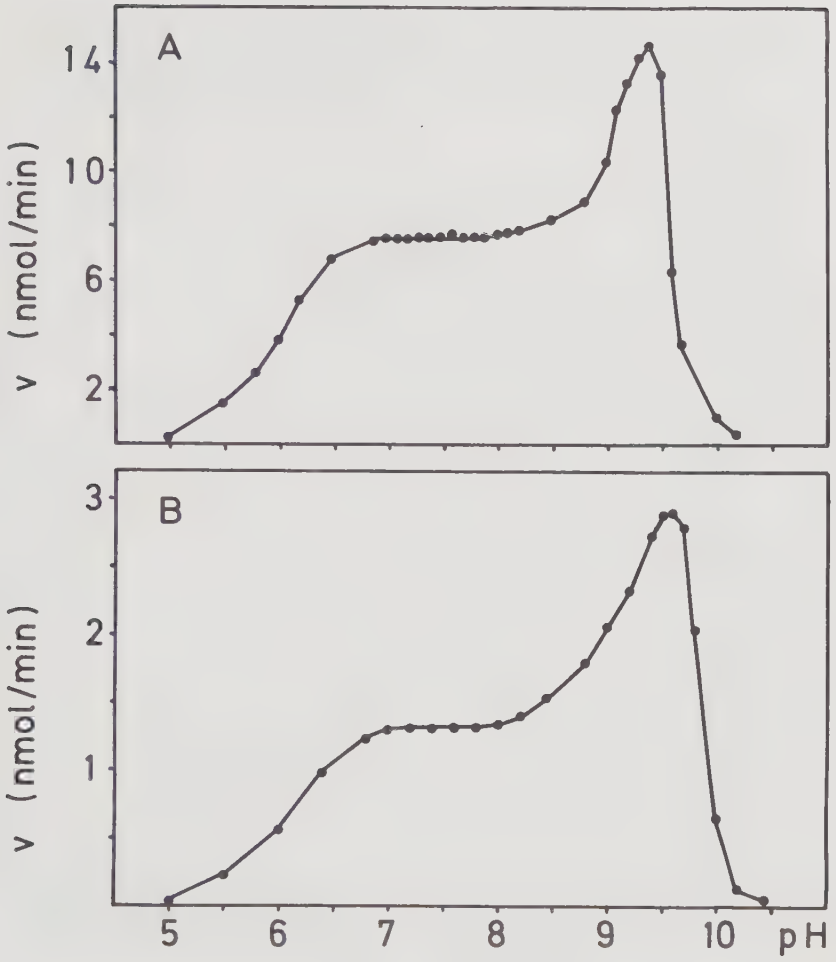


Abb. 14: pH-Abhängigkeit der Hinrekation der NAD-15HPGDH (A) aus SN-Cortex und (B) aus SN-Medulla. Testbedingungen: 100 mM TRAP, 37°C, 1 % Glycerin, 1 mM NAD, 0,05 mM PGE_2. Als Enzymlösungen wurden Verdünnungen der jeweiligen NAD-Agarose-Pools eingesetzt. Der pH wurde bei 37°C direkt im Testansatz gemessen.

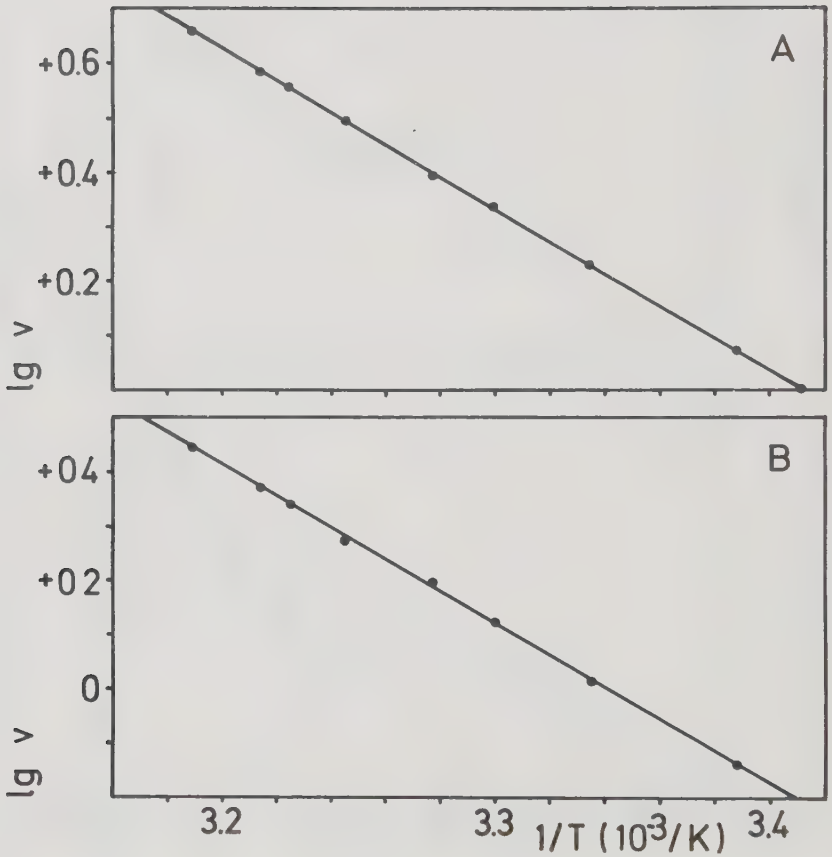


Abb. 15: Temperaturabhängigkeit der Hinreaktion der NAD-15HPGDH (A) aus SN-Cortex und (B) aus SN-Medulla (Arrhenius-Diagramm). Testbedingungen: 100 mM TRAP, pH 7,4 (bei allen Temperaturen), 1 % Glycerin, 2 mM NAD, 0,1 mM PGE_2. Als Enzymlösungen wurden Verdünnungen der jeweiligen NAD-Agarose-Pools eingesetzt, v ist in nmol/min angegeben.

4.7. Einfluß von Substanzen, die in den Enzym-, Substrat- oder Inhibitorlösungen sein können, auf die enzymatische Aktivität der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und -Medulla

Die Aktivität der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex bzw. -Medulla ist abhängig von der Art und der Konzentration der Puffer, in der sie untersucht wird. Bei pH 7,4 und 37°C zeigen die üblicherweise in der Literatur für Dehydrogenasen verwendeten Testpuffer TRAP, KP und TRIS/HCl in einem Konzentrationsbereich zwischen 20 bis 50 mM etwa ähnliche Auswirkungen. Bei höheren Konzentrationen bleibt die Reaktionsgeschwindigkeit von TRAP weitgehend unbeeinflußt, wohingegen KP die Reaktionsgeschwindigkeit vermindert und TRIS/HCl erhöht.

NaCl und KCl bewirken mit steigenden Konzentrationen einen leichten Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit. Ammoniumsulfat führt bei geringen Konzentrationen zunächst zu einer Aktivierung, bei hohen Konzentrationen jedoch zu starker Verminderung der Aktivität der NAD-15HPGDH. Ethanol führt auch schon bei geringen Konzentrationen zu einer Hemmung der NAD-15HPGDH. Die PG-Lösungen für die kinetischen Untersuchungen waren deshalb ethanolfrei. Das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 zeigt bei niedrigen Konzentrationen eine nur geringfügige Beeinflussung der NAD-15HPGDH-Reaktion. Bei Konzentrationen oberhalb der kritischen Micellenbildung von Triton X-100 (0,008 % i.A.) führt das Detergenz jedoch zu einer drastischen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Einige Meßwerte sind in Tab. 9 dargestellt.

Glycerin, ein zur Stabilisierung der NAD-15HPGDH notwendiger Bestandteil der Enzymlösungen, bewirkt innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 0 bis ca. 8 % (v/v) eine im Rahmen des Meßfehlers lineare Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH. Beide Enzyme aus Schweineniere, wie auch das Enzym aus Humanplacenta, verhalten sich gegenüber Glycerin gleich (siehe Abb. 17). Innerhalb des oben genannten Konzentrationsbereiches ist die Glycerinhemmung gegenüber PG unkompe-

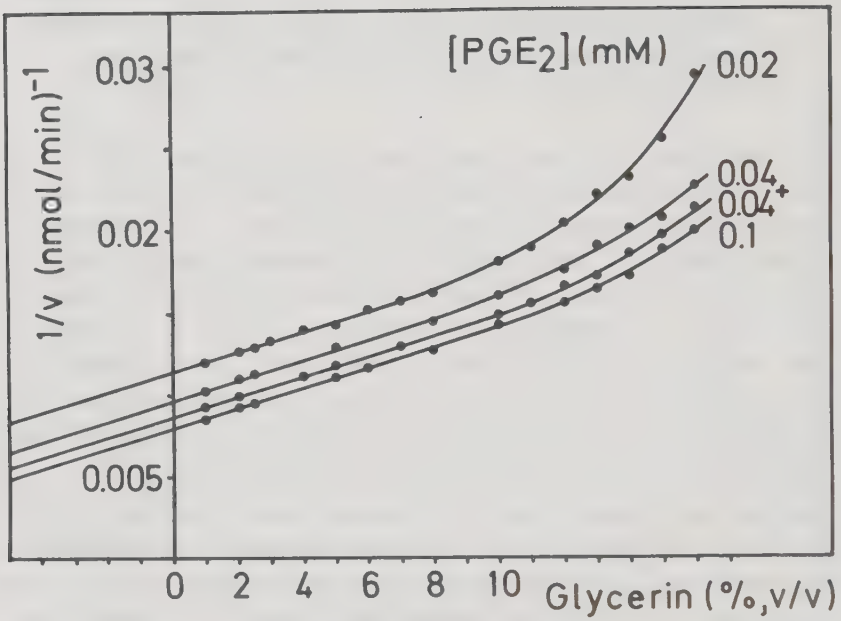


Abb. 16: Dixon-Diagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) mit Glycerin bei festem NAD (2 mM) und variablem PGE_2 (0,02 - 0,1 mM). Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C. (+) NAD-15HPGDH aus SN-Cortex, 1 mM NAD.

Tab. 9: Beeinflussung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla durch Substanzen, die über Enzym-, Substrat- oder Inhibitorlösungen in den Aktivitätstest gelangen können. Testbdgn.: Standardtest (in den Pufferlösungen wurde bei pH 7,4 direkt gemessen). (SC) Cortex, (SM) Medulla.

Puffer und Salze	Konzentration (mM)	(%,v/v)	relat. Reaktionsgeschw. in % der unbeeinflußten Reaktion (Standardtest) NAD-15HPGDH aus SN-Cortex	SN-Medulla
TRAP	20		95	95
	50		98	98
	100		100	100
	200		106	105
	300		118	119
	600		120	119
KP	20		102	100
	50		92	90
	100		85	81
	300		78	75
	500		60	58
TRIS/HCl	20		86	86
	50		95	95
	100		102	105
	300		128	130
	600		143	145
NaCl/KCl	50		102	100
	200		104	103
	600		118	117
$(NH_4)_2SO_4$	20		102	103
	150		130	128
	400		100	98
	700		75	73
andere Zusätze				
Ethanol		1	90	88
Triton X-100		0.001	102	103
		0,005	115	118
		0,01	140	143
		0,1	172	178

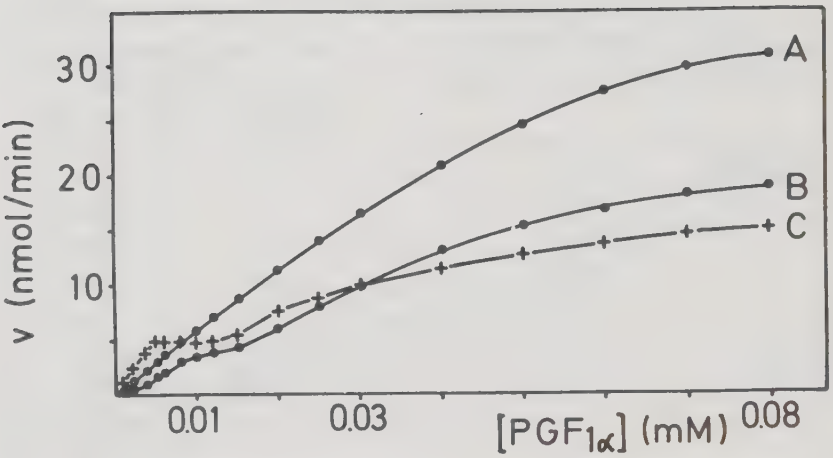


Abb. 17: V/S-Diagramm: Einfluß von höheren Glycerinkonzentrationen in unterschiedlichen Puffersystemen auf die Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei festem NAD (1 mM) und variablem $PGF_{1\alpha}$ (0,001 - 0,08 mM). (A) 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 37°C; (B) wie oben jedoch 16,5 % Glycerin; (C) 10 mM KP, pH 8,0, 16,5 % Glycerin, 0,7 mM EDTA, 10 mM ME, 175 mM Sucrose, 37°C.

titiv (Abb. 17). In 100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C, errechnet sich bei konstantem NAD (2 mM) und variablem PGE_2 (0,02 - 0,1 mM) für Glycerin eine K_{ii} von 1,32 mM. Unter Standardtestbedingungen (siehe 3.1.1.) wird die NAD-15HPGDH bei 2 mM NAD und 0,1 mM PGE_2 von der höchsten in den kinetischen Untersuchungen eingesetzten Glycerinkonzentration von 1 % zu 6,2 % gehemmt. 13 % Glycerin (v/v) hemmen die Hinreaktion der NAD-15HPGDH unter diesen Bedingungen zu 50 %.

Wie aus Abb. 17 ersichtlich, ist die Glycerinhemmung bei Glycerinkonzentrationen oberhalb 8 % (v/v) nicht mehr linear. Bei Glycerinkonzentrationen oberhalb 8 % (v/v; i.T.) zeigt das Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Hinreaktion der NAD-15HPGDH ein scheinbar verändertes kinetisches Verhalten des Enzyms. Je höher die Glycerinkonzentration, desto stär-

ker weichen die Meßreihen von dem Bild einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik ab und zeigen im V/S- (Abb. 17) wie im doppelt reziproken Diagramm (Abb. 18) komplexe "Wavy Curves". Dieser Effekt ist in KP ausgeprägter als in TRAP. Begünstigend wirken außerdem ein Herabsetzen der Testtemperatur auf 20°C, die Viskosität des Testpuffers erhöhende Zusätze wie Sucrose und eine Erniedrigung der Substratkonzentrationen.

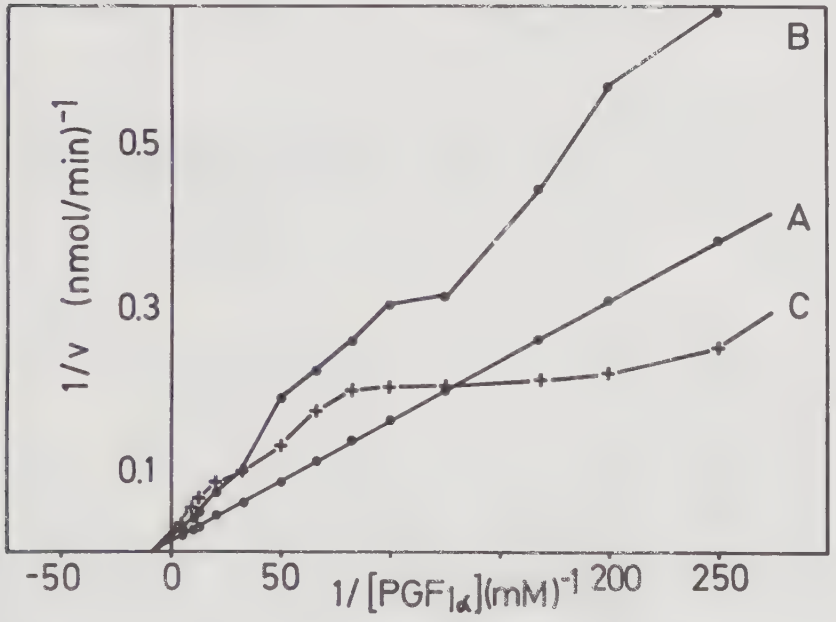


Abb. 18: Lineweaver-Burk Diagramm: Legende siehe Abb. 17.

In Abb. 19 ist das Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) in zwei unterschiedlichen Testsystemen dargestellt. In 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 20°C zeigen die Meßpunkte im doppelt reziproken Diagramm sowohl bei festem NAD (0,5 mM) und variablem $PGF_{2\alpha}$ (0,005 - 0,2 mM) wie auch bei festem $PGF_{2\alpha}$ (0,005 mM) und variablem NAD (0,02 - 1,0 mM) einen linearen Verlauf (Abb. 19, Kurve A).

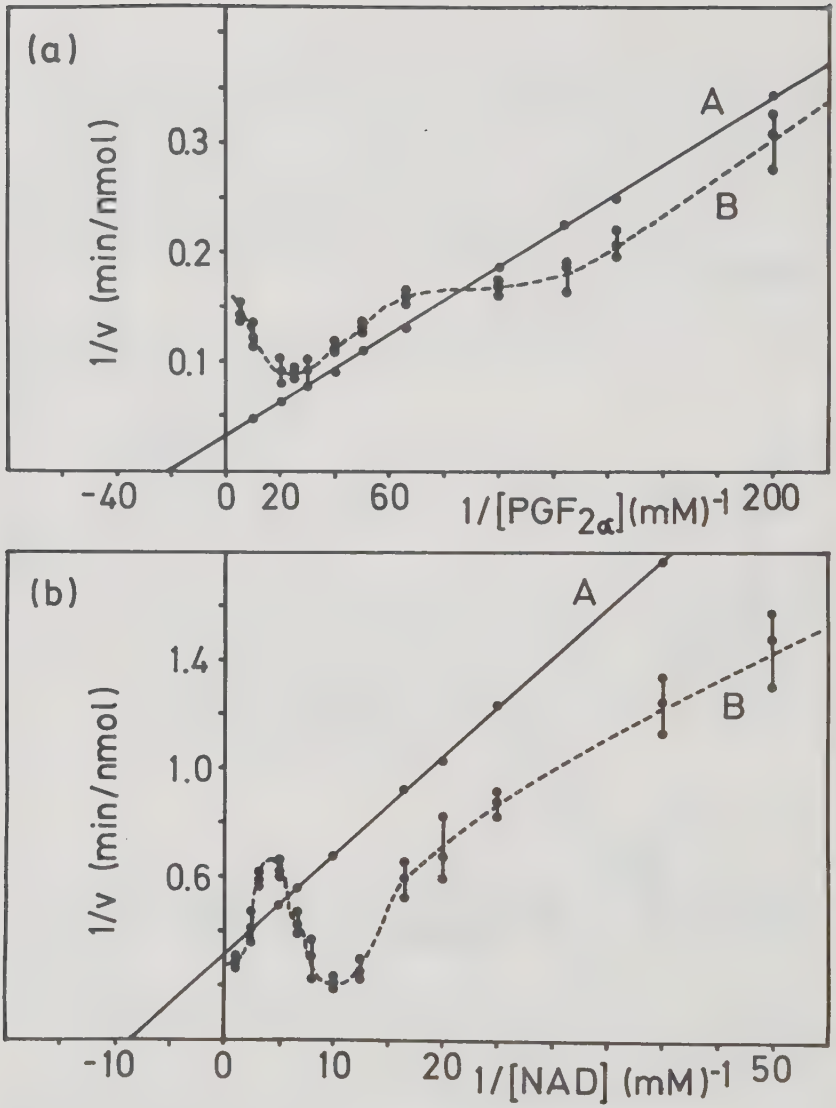


Abb. 19: Lineweaver-Burk Diagramm der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM); (a) bei festem NAD (0,5 mM) und variablem $PGF_{2\alpha}$ (0,005 - 0,2 mM), (b) bei festem $PGF_{2\alpha}$ (0,005 mM) und variablem NAD (0,02 - 1,0 mM). Für die Meßreihe A wurde eine geringere Enzymmenge als für Meßreihe B eingesetzt. Testbdgn.: (A) 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 20°C, (B) 10 mM KP, pH 8,0, 16 % Glycerin, 175 mM Sucrose, 10 mM ME, 20°C.

In 10 mM KP, pH 8,0, 16 % Glycerin, 175 mM Sucrose, 10 mM ME, 20°C, einem Testsystem,wie es Bardsley & Crabbe (18) für ihre kinetischen Untersuchungen einer NAD-15HPGDH aus Humanplacenta verwendet haben, zeigen beide Meßreihen einen komplexen Verlauf ("Wavy Curves") mit jeweils mindestens drei Wendepunkten (Abb. 19, Kurve B). Die Kurven B sind in ihrem Verlauf eine genaue Reproduktion des von Bardsley & Crabbe für das Humanplacentaenzym gefundenen Anfangsgeschwindigkeitsmusters.

4.8. KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR HINREAKTION DER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX UND SN-MEDULLA

4.8.1. Kontrolluntersuchungen

4.8.1.1. Dünnschichtchromatographische Trennung von Prostaglandinen

Für die chromatographische Trennung der PG wurden überwiegend HPTLC-Platten verwendet, da sie bei kürzeren Laufzeiten eine bessere Auflösung bringen als mit den üblicherweise verwendeten DC-Platten zu erreichen ist. Über die kurzen Laufzeiten wie auch die niedrigen Temperaturen (4°C, -40°C) konnte erreicht werden, daß die PG über den Zeitraum der Chromatographie hinlänglich stabil waren. Die linearen DC-Techniken (siehe 3.4.12.) waren alle nur bedingt brauchbar. So konnten zwar PG unterschiedlicher Reihen (PGE, PGF, PGA, PGD) wie auch deren Metabolite ausreichend aufgetrennt werden, eine Unterscheidung zwischen PG der gleichen Reihe, mit jedoch unterschiedlicher Anzahl von Doppelbindungen (PGE_1, PGE_2) und deren Metabolite gelang jedoch nicht. Eine Auftrennung solcher komplexer Gemische konnte jedoch über die zirkulare Gradienten-DC erreicht werden (siehe 3.4.12.).

4.8.1.2. Überprüfung der Produkte der enzymatischen Reaktion

Die Inkubation der NAD-15HPGDH (NAD-Agarose-Pool) mit NAD und PG führte jeweils ausschließlich zu Produkten, die sich chromatographisch wie die entsprechenden 15KPG verhielten. Die Reaktionsprodukte der Umsetzungen mit PGB_1, PGD_1 und PGD_2 konnten nicht definiert werden, da die entsprechenden Referenzsubstanzen ($15KPGB_1$, etc.) nicht zur Verfügung standen. Für die Rückreaktion der NAD-15HPGDH (Inkubation mit NADH und $15KPGE_2$) wurde neben nicht umgesetzten 15KPG ein Produkt erhalten, das sich chromatographisch wie PGE_2 verhielt. Die jeweils parallel durchgeführten Kontrollansätze ohne Enzym führten zu keiner Umsetzung der Substrate. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden alle Reaktionsgemische in jeweils mehreren unterschiedlichen DC-Systemen aufgetrennt (siehe 3.4.12.).

4.8.1.3. Untersuchung der Enzymfraktionen auf Fremdaktivitäten

Soweit es mit den unter 3.4.13. beschriebenen Testsystemen und Inkubationsansätzen beurteilt werden konnte, waren die NAD-Agarose-Pools der NAD-15HPGDH-Präparationen aus SN-Cortex und SN-Medulla frei von Fremdaktivitäten. Mit diesen Untersuchungen konnte zumindest sichergestellt werden, daß in diesen Enzympools keine Enzymaktivitäten auftraten, die die beabsichtigten kinetischen Untersuchungen hätten stören können.

4.8.2. Prostaglandine als Substrate

Die Prostaglandine der E-, F-, A- und D-Reihe sind Substrate für die Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex, wie auch der aus SN-Medulla. Die extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten (V_1) für PGE_2, PGE_1, $PGF_{2\alpha}$, $PGF_{1\alpha}$ und PGA_1 liegen in der gleichen Größenordnung. V_1 für PGD_2 und PGD_1 ist bei beiden Enzymen um zwei Zehnerpotenzen geringer (Tab. 10). Die Affinität beider NAD-15HPGDH zu den aufgeführten Prostaglandinen ist gleichartig und fällt in der Reihenfolge $PGE_2 > PGE_1 > PGA_1 > PGF_{2\alpha} > PGF_{1\alpha} > PGD_2 > PGD_1$. Der Unterschied in der Affinität, ausgedrückt durch die K_{iPG}, beträgt von PGE zu PGF und PGA etwa eine Zehnerpotenz, von PGE zu PGD etwa zwei Zehnerpotenzen. Die Affinitäten der beiden NAD-15HPGDH für das Substrat NAD bleiben bei der Verwendung obiger PG gleich. Die aus Primär- und Sekundärdiagrammen der Meßreihen ermittelten kinetischen Konstanten sind in Tab. 10 wiedergegeben.

4.8.2.1. NAD und PGE_2 als Substrate der Hinreaktion

Bei beiden Enzymen zeigte sich bei keiner der Messungen im üblichen Testsystem (100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C) im verwendeten Konzentrationsbereich eine Spontanreaktion zwischen PG und NAD ohne Enzym, PG und Enzym ohne NAD oder NAD und Enzym ohne PG. Beide Enzyme verhielten sich gleichartig. Die erhaltenen Meßdaten der NAD/PG-Kreuzserien wurden graphisch manuell nach Lineweaver-Burk (130), Hanes (85), Eadie-Hofstee (63,104) und Eisenthal & Cornish-Bowden (64) ausgewertet. Die so erhaltenen Primär- und Sekundär-Diagramme waren im Rahmen der Meßgenauigkeit linear. Der Übersichtlichkeit halber sind hier nur die allgemein bekannten Lineweaver-Burk-Diagramme dargestellt (Abb. 20, 21 und 23, 24). Im Lineweaver-Burk-, wie im Hanes-Diagramm, lagen die Schnittpunkte der Geraden im 2. Quadranten, im Eadie-Hofstee-

Tab. 10: Kinetische Konstanten der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla für PG, die als Substrate angenommen werden. Die Konstanten wurden graphisch aus den Primär- und Sekundärdiagrammen der Meßreihen ermittelt. Testbdgn.: Standardtest, 2 mM NAD, 0,025 - 0,1 mM PG.

PG	relative V_1 (V_{1PGE_2} = 100 %) (%)	K_{PG} (mM)	K_{iPG} (mM)	K_{NAD} (mM)	K_{iNAD} (mM)	NAD-15HPGDH aus
PGE_2	100	0,0035	0,0066	0,075	0,142	(SC)
	100	0,0034	0,0071	0,063	0,133	(SM)
PGE_1	99	0,0049	0,0085	0,082	0,138	(SC)
	98	0,0051	0,0092	0,088	0,136	(SM)
$PGF_{2\alpha}$	92	0,051	0,094	0,074	0,136	(SC)
	93	0,045	0,082	0,064	0,135	(SM)
$PGF_{1\alpha}$	92	0,052	0,095	0,074	0,135	(SC)
	91	0,054	0,097	0,081	0,139	(SM)
PGA_1	95	0,0098	0,017	0,080	0,138	(SC)
	95	0,0095	0,015	0,078	0,137	(SM)
PGD_2	0,8	0,553	0,910	0,081	0,134	(SC)
	0,8	0,564	0,932	0,085	0,132	(SM)
PGD_1	0,75	0,593	0,961	0,081	0,132	(SC)
	0,7	0,590	0,959	0,079	0,134	(SM)

Diagramm konvergierten sie auf einen Schnittpunkt im 4. Quadranten. Dieses bei beiden Enzymen gleichartige Verhalten läßt auf einen sequentiellen Mechanismus für beide Enzyme schließen. Die erhaltenen kinetischen Konstanten, Mittelwerte der aus allen Diagrammtypen ermittelten Werte, sind in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Kinetische Konstanten der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla für die Substrate NAD und PGE_2. Die Konstanten sind Mittelwerte der aus den in 3.4.14. beschriebenen Diagrammen ermittelten Werte. Testbdgn.: siehe Legenden der Abb. 20, 21 und 23, 24.

	K_{PG} (mM)	K_{iPG} (mM)	K_{NAD} (mM)	K_{iNAD} (mM)	NAD-15HPGDH aus
PGE_2	0,0035	0,0066	0,075	0,142	(SC)
	0,0034	0,0071	0,063	0,133	(SM)

Bei sehr hohen PG-Konzentrationen sind die doppelt reziproken Diagramme nicht mehr linear. Oberhalb 0,25 mM i.T. zeigen PGE_2 (Abb. 23 und Abb. 25) und oberhalb 0,5 mM i.T. $PGF_{2\alpha}$ (Abb. 25) den Effekt einer beginnenden Substrataktivierung. Dieses Verhalten ist umso ausgeprägter, je höher die Cosubstratkonzentrationen sind.

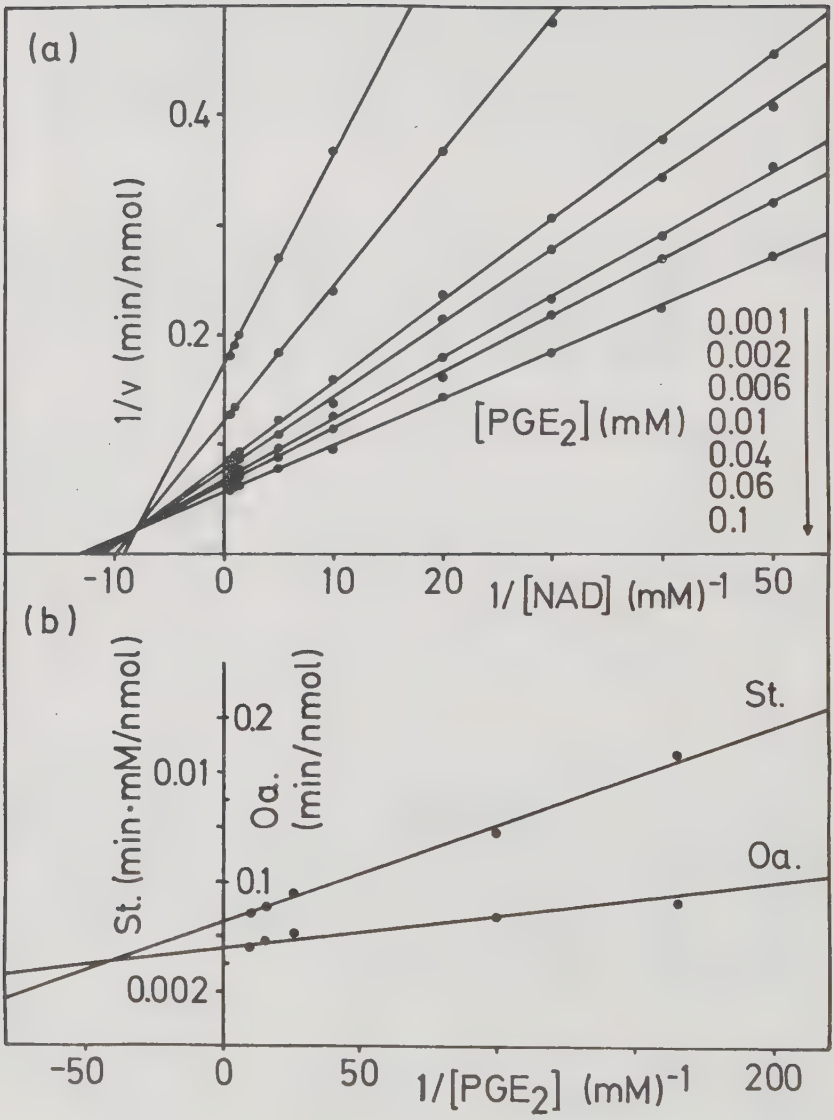


Abb. 20: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei variablem NAD und festem PGE_2. Testbdgn.: Standardtest, 0,02 - 2 mM NAD, 0,001 - 0,1 mM PGE_2.

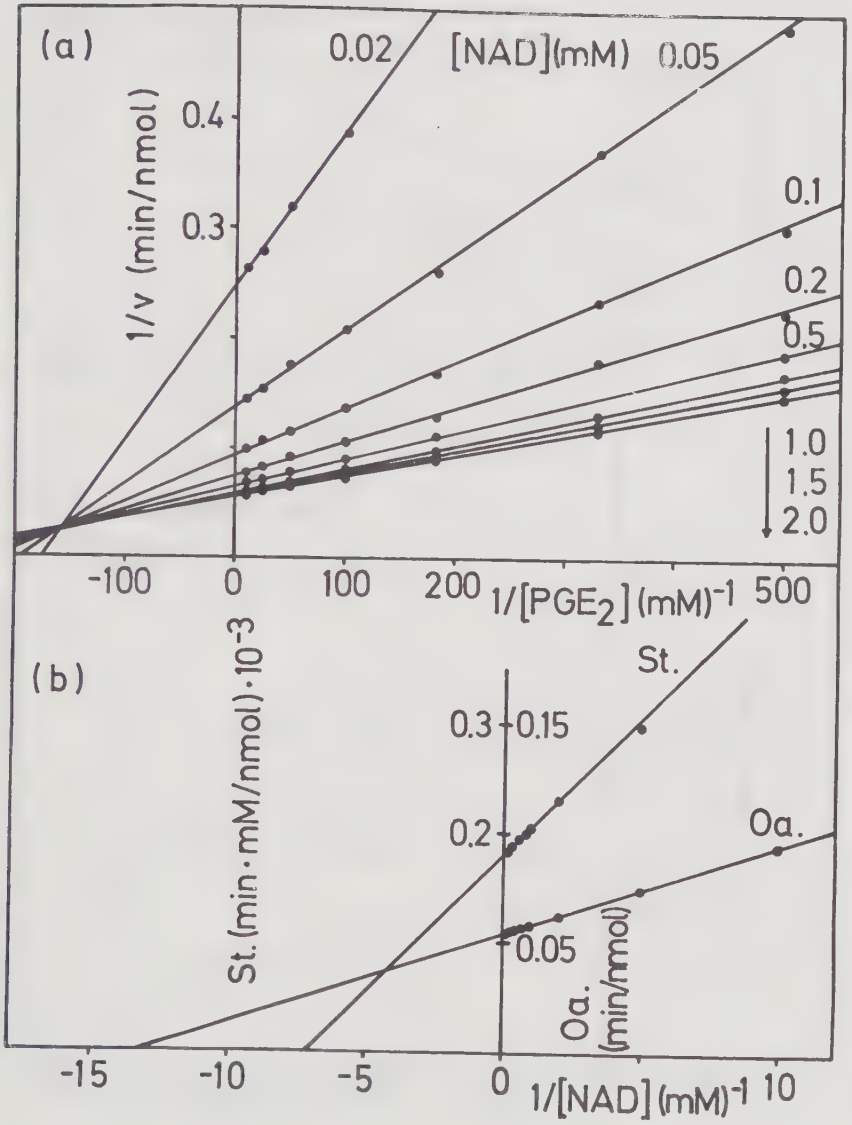


Abb. 21: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei variablem PGE_2 und festem NAD. Testbdgn.: Standardtest, 0,01 - 0,1 mM PGE_2, 0,02 - 2 mM NAD.

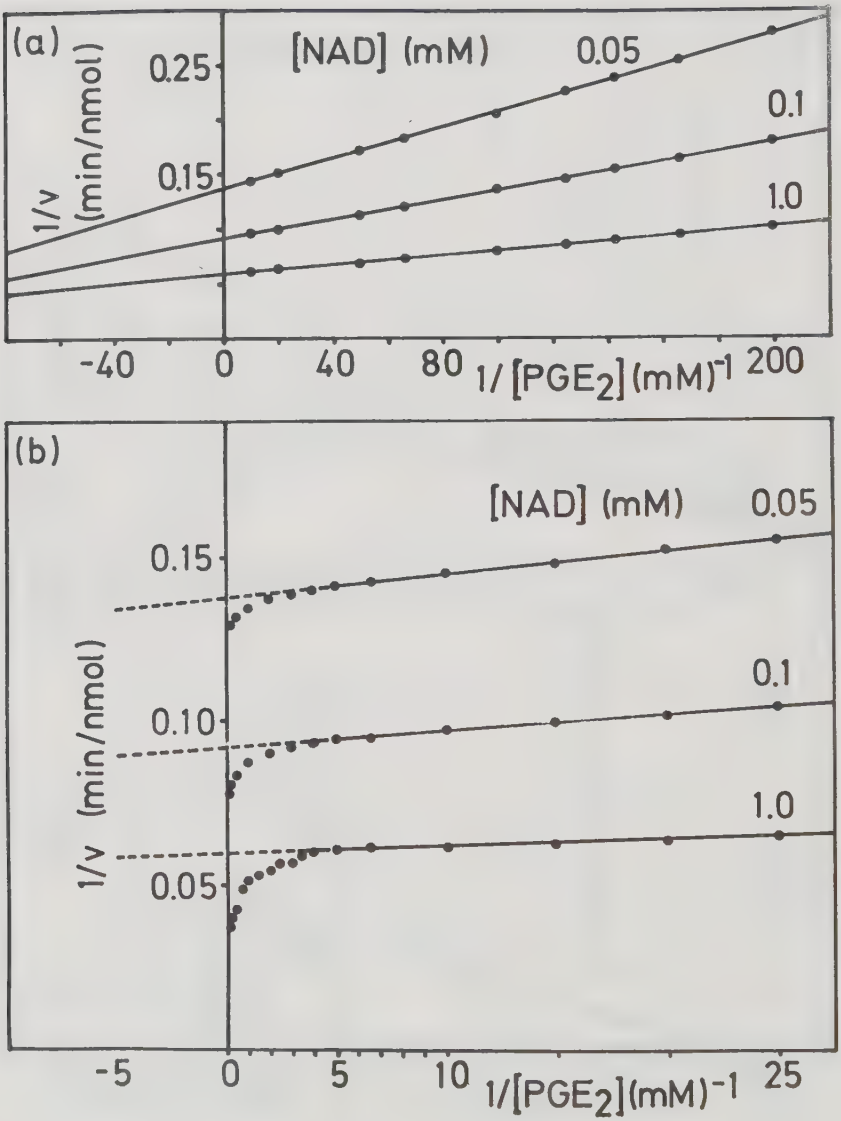


Abb. 22: Aktivierung der NAD-15HPGDH-(SC) durch hohe PGE_2 Konzentrationen. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 37°C, 0,05 - 1,0 mM NAD, (a) 0,005 - 0,1 mM PGE_2, (b) 0,04 - 10,0 mM PGE_2.

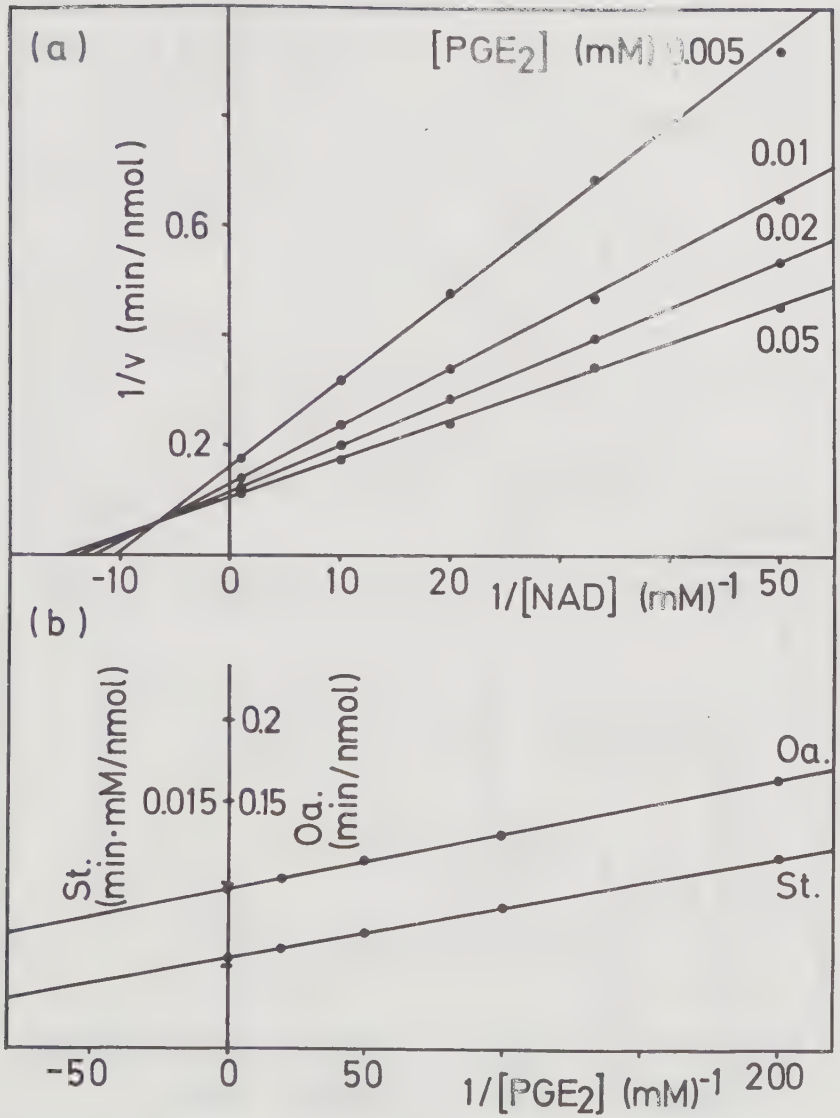


Abb. 23: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) bei variablem NAD und festem PGE_2. Testbdgn.: Standardtest, 0,02 - 1 mM NAD, 0,005 - 0,05 mM PGE_2.

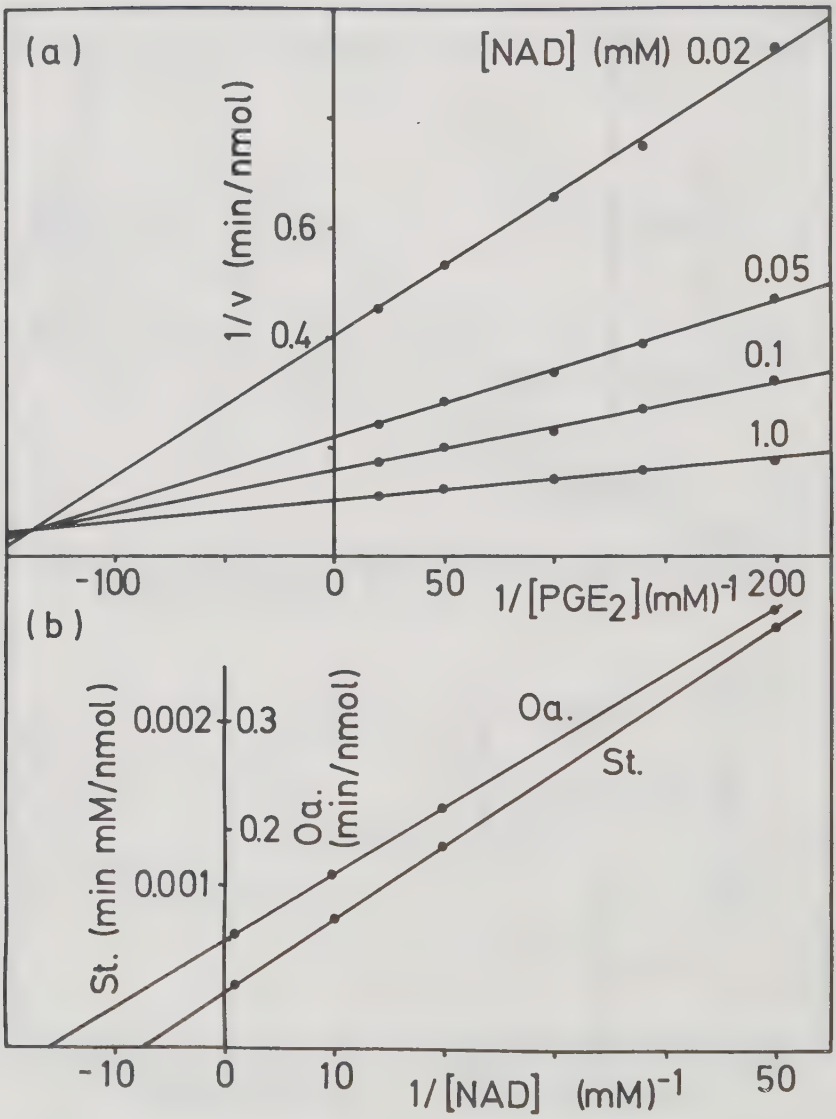


Abb. 24: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) bei variablem PGE_2 und festem NAD. Testbdgn.: 0,005 - 0,05 mM PGE_2, 0,02 - 1 mM NAD.

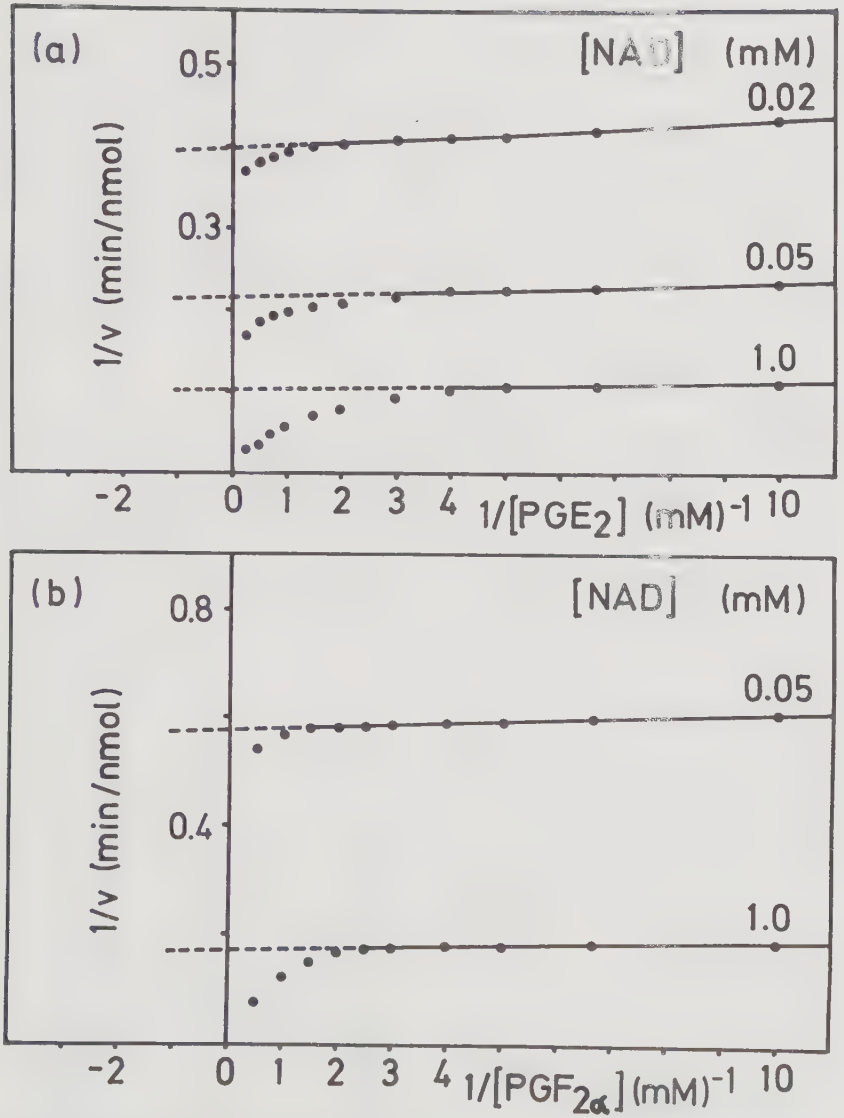


Abb. 25: Aktivierung der NAD-15HPGDH-(SM) durch hohe PG-Konzentrationen. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 37°C, (a) 0,02 - 1,0 mM NAD, 0,1 - 4,0 mM PGE_2, (b) 0,05 - 1,0 mM NAD, 0,1 - 2,0 mM $PGF_{2\alpha}$.

4.8.3. Prostaglandin-Metabolite und PGB_1 als Inhibitoren der Hinreaktion

Die PG-Metaboliten 15KPGE, -F, -A und $13,14H_2$-15KPGE und -F hemmen die Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex, wie auch die der aus SN-Medulla. Beide Enzyme werden gleichartig gehemmt. Bezüglich der jeweiligen PG, wie auch bezüglich NAD ist die Hemmung nicht kompetitiv (siehe Produkthemmung mit $15KPGE_2$, Abb. 39-42; Diagramme für die anderen Meßreihen sind hier nicht gezeigt). Die Hemmkonstanten (siehe Tab. 12) haben dabei für die 15KPG und $13,14H_2$-15KPG einer PG-Reihe etwa gleiche Größenordnungen.

Tab. 12: Kinetische Konstanten der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla durch PG-Metabolite. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C, 1 % EtOH, 2 mM NAD, 0,1 mM PGE_2, 0,002 - 0,05 mM des jeweiligen PG-Metaboliten. Die Konstanten wurden graphisch aus den Primär- und Sekundärdiagrammen der jeweiligen Meßreihen ermittelt.

PG-Metabolit	NAD-15HPGDH-(SC)		NAD-15HPGDH-(SM)	
	K_i (mM)	K_{ii} (mM)	K_i (mM)	K_{ii} (mM)
$15KPGE_2$	0,046	0,250	0,039	0,170
$15KPGE_1$	0,032	0,351	0,029	0,258
$13,14H_2$-$15KPGE_2$	0,052	0,241	0,048	0,253
$13,14H_2$-$15KPGE_1$	0,049	0,261	0,048	0,265
$15KPGF_{2\alpha}$	0,510	3,606	0,535	3,494
$15KPGF_{1\alpha}$	0,515	3,652	0,542	3,583
$13,14H_2$-$15KPGF_{2\alpha}$	0,654	2,651	0,623	2,808
$13,14H_2$-$15KPGF_{1\alpha}$	0,682	2,737	0,645	2,810
$15KPGA_1$	0,241	0,685	0,254	0,672

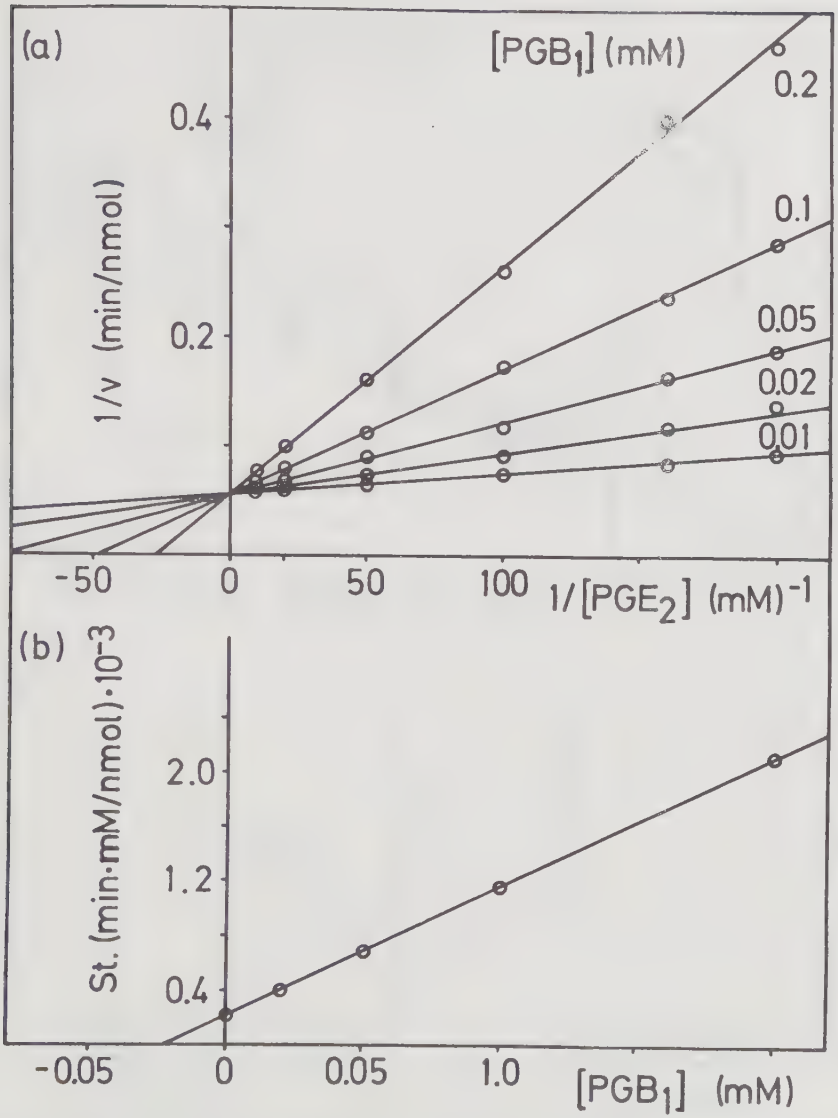


Abb. 26: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) mit PGB_1 bei variablem PGE_2 und festem NAD. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C, 1 % EtOH, 0,005 - 0,05 mM PGE_2, 2 mM NAD.

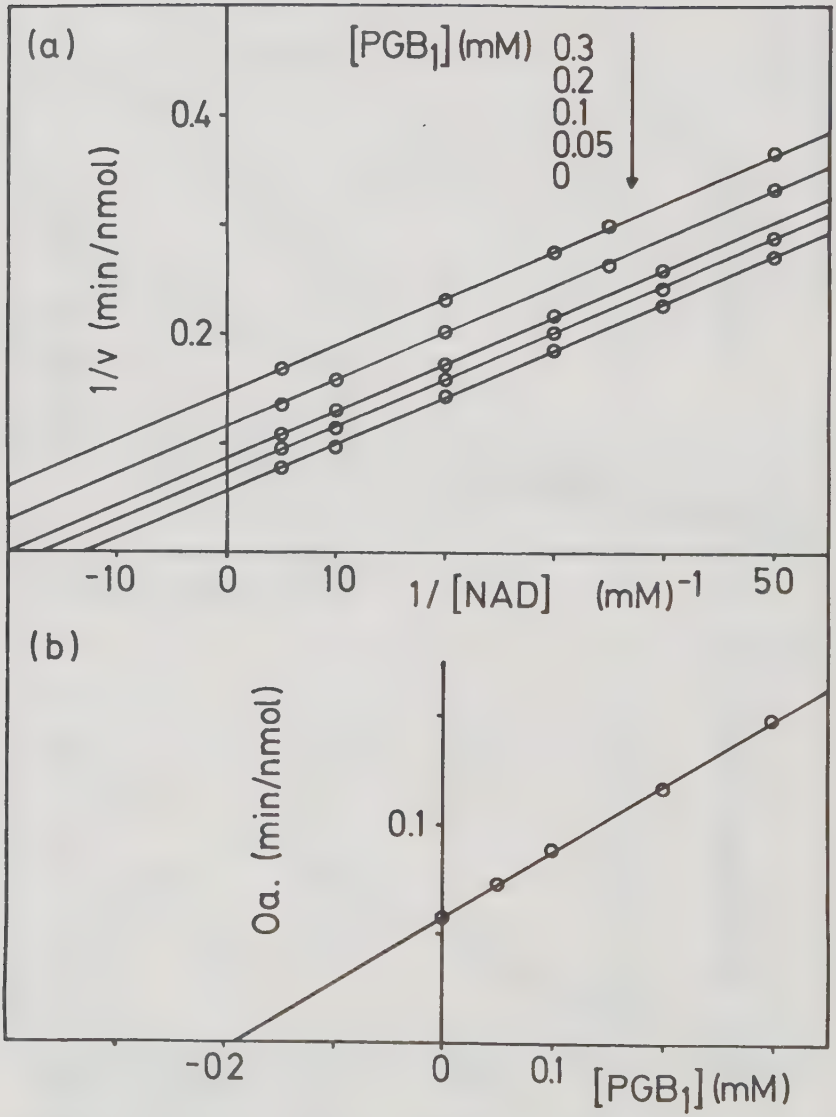


Abb. 27: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) mit PGB_1 bei variablem NAD und festem PGE_2. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C, 1 % EtOH, 0,02 - 2 mM NAD, 0,1 mM PGE_2.

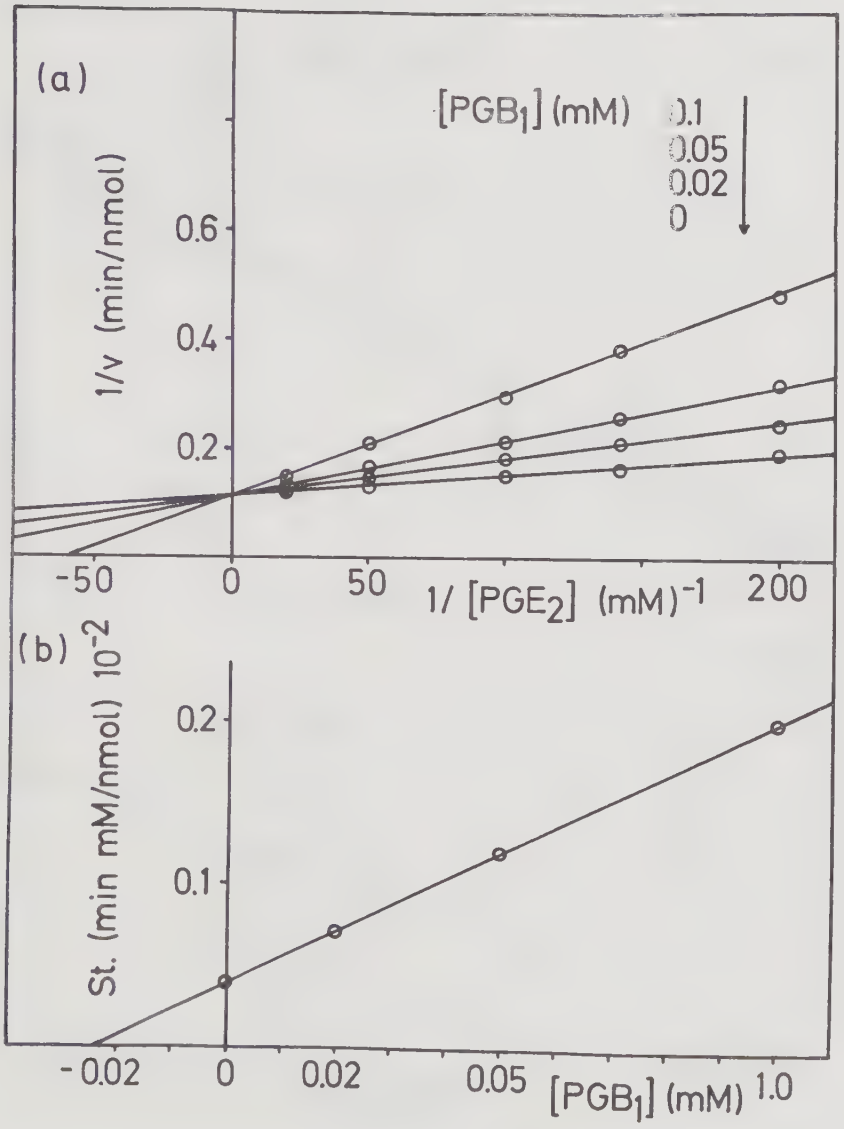


Abb. 28: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) mit PGB_1 bei variablem PGE_2 und festem NAD. Testbdgn.: siehe Abb. 26.

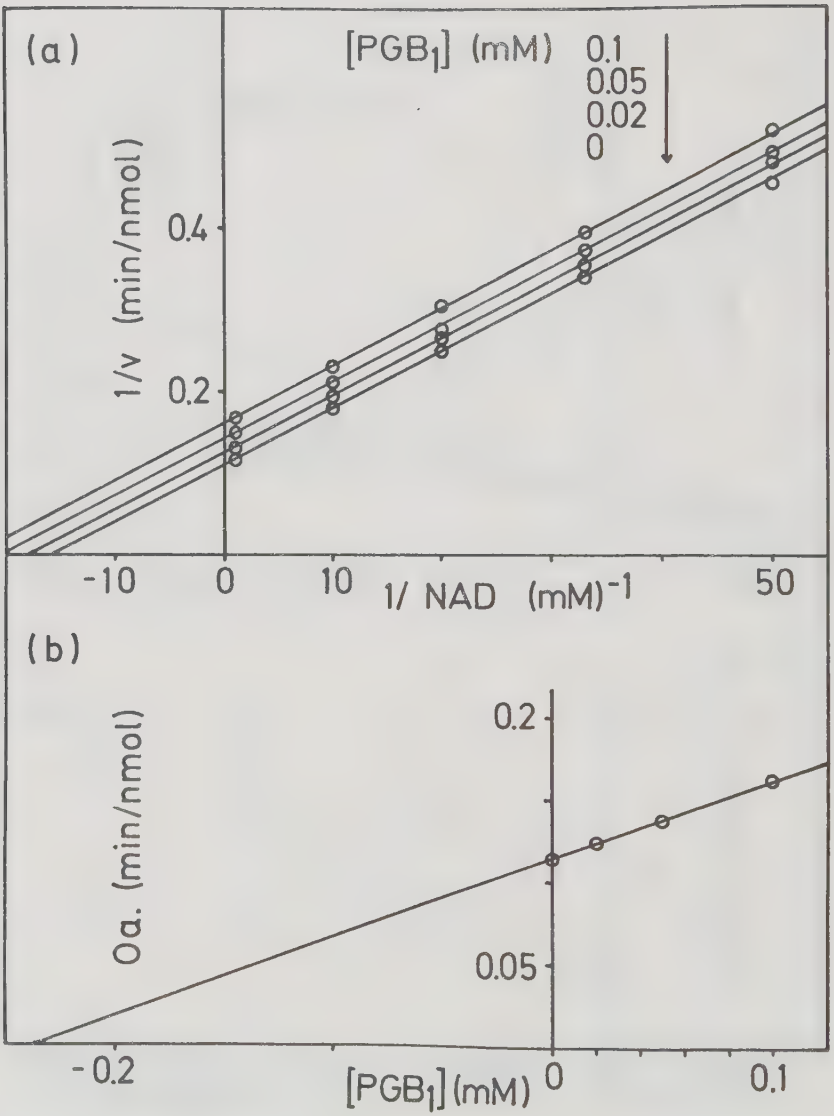


Abb. 29: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) mit PGB_1 bei variablem NAD und festem PGE_2. Testbdgn.: siehe Abb. 27.

Die Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC), wie auch die der NAD-15HPGDH-(SM), wird durch PGB_1 stark gehemmt. Bei 0,05 mM PGE_2 und 2 mM NAD (100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C, 1 % EtOH) beträgt die Hemmung bei 0,05 mM PGB_1 17 % bzw. 18 %, bei 0,2 mM PGB_1 40 % bzw. 43 %. Die Hemmung ist gegenüber PGE_2 kompetitiv (Abb. 26, 28), gegenüber NAD unkompetitiv (Abb. 27, 29), d.h. PGB_1 verhält sich gegenüber NAD als kompetitiver "dead end"-Inhibitor. Innerhalb der eingesetzten Konzentrationen verhielten sich alle Meßreihen im Rahmen des Meßfehlers linear. Die kinetischen Konstanten der PGB_1-Hemmung sind in Tab. 13 aufgeführt.

Tab. 13: Inhibitionsmuster und Hemmkonstanten der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla mit PGB_1. Die Hemmkonstanten wurden aus den Primär- und Sekundärdiagrammen der Meßreihen ermittelt. Testbdgn.: siehe Abb. 26-29.

Inhibitor	NAD variabel		PGE_2 variabel		NAD-15HPGDH aus
	K_i (mM)	K_{ii} (mM)	K_i (mM)	K_{ii} (mM)	
PGB_1	unkompetitiv		kompetitiv		
		0,192	0,021		(SC)
		0,243	0,022		(SM)

4.8.4. Nucleotide als Substrate und "Inhibitoren" der Hinreaktion

Das natürliche Substrat beider NAD-15HPGDH aus Schweineniere ist NAD. Bei PGE_2 als zweitem Substrat sind die doppel reziproken Diagramme der Hinreaktion beider NAD-15HPGDH (Abb. 30) bis 10 mM NAD linear. Die K_{NAD} für die Prostaglandine der E-, F-, A- und D-Reihe liegen zwischen 63 µM und 88 µM (siehe Tab. 10). Die K_{iNAD} bei Verwendung dieser PG als zweitem Substrat (132 µM - 142 µM) differieren, berücksichtigt man den Meßfehler, nicht signifikant.

S-NAD ist ebenfalls Substrat der NAD-15HPGDH aus Schweineniere. Seine Affinität zu NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla ist mit der von NAD vergleichbar. Die mit S-NAD erzielten Maximalgeschwindigkeiten betragen etwa ein Viertel der mit NAD erzielten Maximalgeschwindigkeiten. Die aus S-NAD/PGE_2-Kreuzserien für NAD-15HPGDH aus SN-Cortex erhaltenen Diagramme sind in Abb. 31 und 32 dargestellt. Die kinetischen Konstanten der Hinreaktion mit S-NAD und PGE_2 als Substraten sind in Tab. 14 zusammengefaßt.

Nach der Methode von Rudolph & Fromm (179) wurde S-NAD als alternatives Substrat zu NAD eingesetzt. Die Messung der NAD/PGE_2-Reaktion (hier nur gezeigt für NAD-15HPGDH aus SN-Cortex) in Konkurrenz zu einer festen S-NAD-Konzentration (0,1 mM i.T.) ergibt eine "Hemmung", die, aufgetragen gegen die reziproke PGE_2-Konzentration, nicht linear ist (Abb. 33). Die aus den Meßpunkten erhaltene Kurve ist aufwärts konkav und entspricht in ihrem Verlauf der allgemeinen Gleichung einer 2/1-Funktion; siehe Fromm (73).

NADP ist für die NAD-15HPGDH aus Schweineniere weder Substrat noch signifikanter Inhibitor. Erst bei hohen NADP-Konzentrationen zeigt sich eine leichte Hemmung der enzymatischen Reaktion (siehe Tab. 14).

5'AMP und die zyklischen Mucleotide cAMP und cGMP sind keine Substrate der NAD-15HPGDH-Reaktion. Wie aus Tab. 15 ersichtlich, führen erst Konzentrationen im mM-Bereich zu einer deutlichen Hemmung der Reaktion.

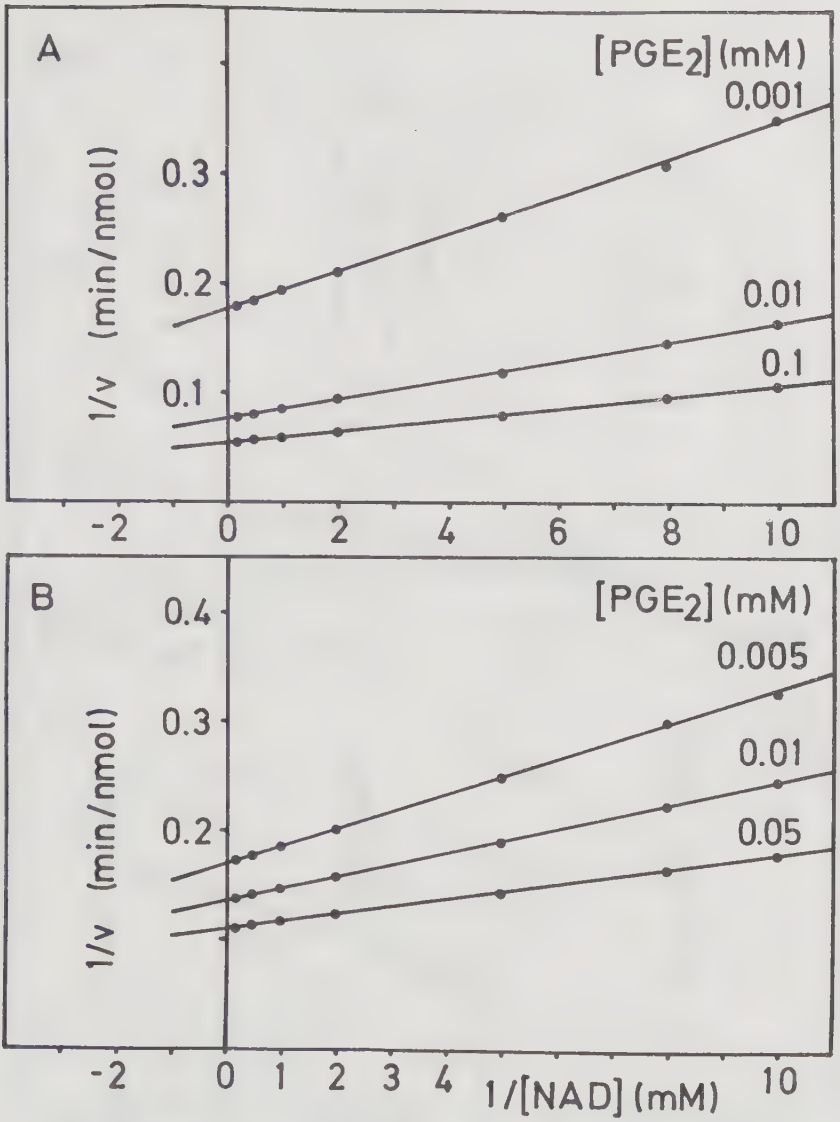


Abb. 30: Linearität der Lineweaver-Burk Diagramme bei hohen NAD-Konzentrationen. (A) Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei festem PGE_2 und variablem NAD (0,1 - 10 mM), (B) Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) bei festem PGE_2 und variablem NAD (0,1 - 10 mM). Testbdg.: Standardtest.

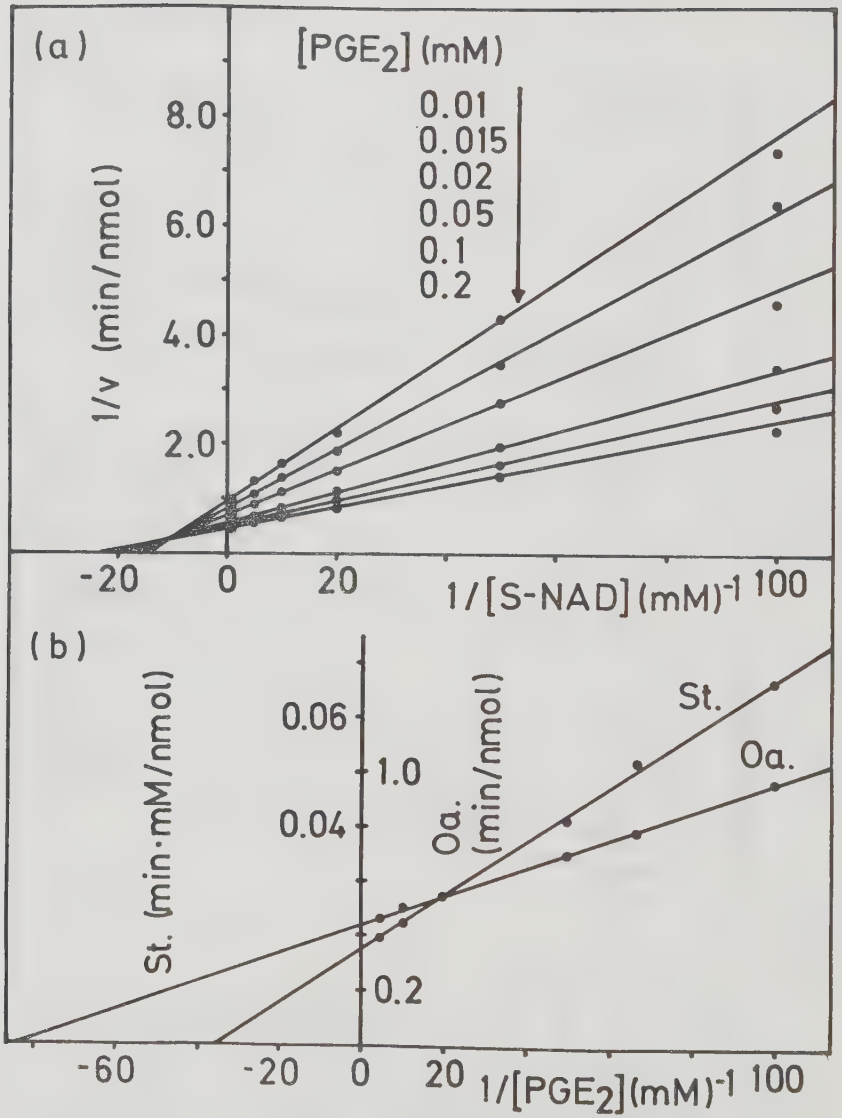


Abb. 31: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei festem PGE_2 und variablem S-NAD. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 0,01 - 1,0 mM S-NAD, 37°C.

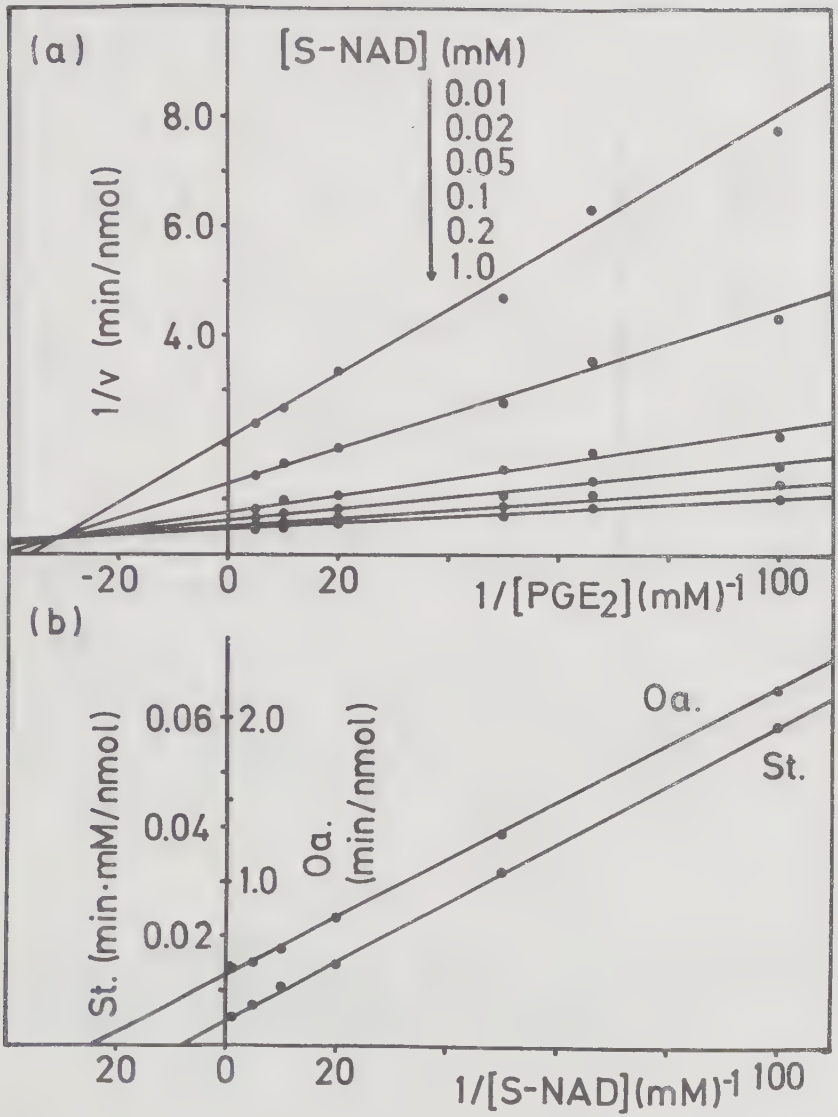


Abb. 32: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei festem S-NAD und variablem PGE_2. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 0,01 - 0,2 mM PGE_2, 37°C.

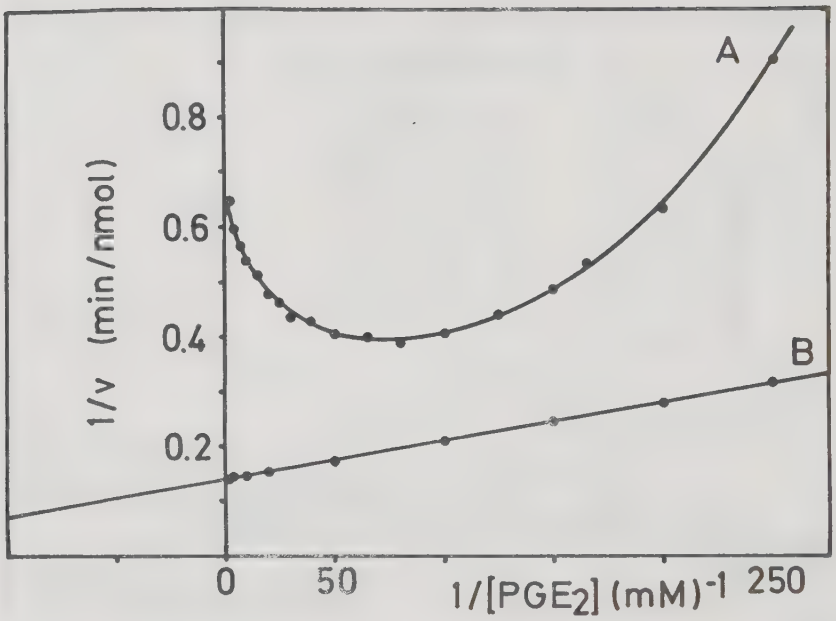


Abb. 33: S-NAD-Konkurrenz zur Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei festem NAD und variablem PGE_2. Die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten der Hinreaktion mit NAD und PGE_2 wurden (A) in Gegenwart und (B) in Abwesenheit von 0,1 mM S-NAD gegen die reziproke PGE_2-Konzentration aufgetragen. Testbdg.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 0,05 mM NAD, 0,002 - 0,5 mM PGE_2.

Tab. 14: Kinetische Konstanten der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex für die Substrate S-NAD und PGE_2. Die Konstanten sind Mittelwerte der aus den unter 3.4.14. beschriebenen Diagramme ermittelten Werte. Testbdgn.: siehe Abb. 31 und 32.

K_{PGE_2} (µM)	K_{iPGE_2} (µM)	$K_{S\text{-}NAD}$ (µM)	$K_{iS\text{-}NAD}$ (µM)
11,9	27,8	38,5	106

Tab. 15: Einfluß verschiedener Nucleotide auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla. Testbdgn.: Standardtest (3.1.1.).

NAD Konzentration (mM i.T.)	PG	Nucleotid	Aktivität in % der entsprech. ungehemmten Reaktion (SC)	(SM)
0,5	0,05 mM PGE_2	2 mM NADP	100	100
0,1	0,05 mM PGE_2	2 mM NADP	95	94
0,1	0,05 mM PGE_2	10 mM NADP	83	85
0,05	0,05 mM $PGF_{2\alpha}$	5 mM NADP	87	85
0,05	0,05 mM PGE_2	0,1 mM NADPH	100	100
0,05	0,05 mM PGE_2	1 mM NADPH	98	100
0,05	0,05 mM $PGF_{2\alpha}$	1 mM NADPH	95	97
0,1	0,05 mM PGE_2	1 mM cAMP	100	100
0,05	0,05 mM PGE_2	10 mM cAMP	75	77
0,05	0,05 mM $PGF_{2\alpha}$	10 mM cAMP	72	72
0,05	0,05 mM PGE_2	1 mM cGMP	100	97
0,05	0,05 mM PGE_1	10 mM cGMP	74	74
0,05	0,05 mM $PGF_{1\alpha}$	10 mM cGMP	59	62
0,5	0,05 mM PGE_2	1 mM 5'AMP	100	97
0,1	0,05 mM PGE_2	1 mM 5'AMP	92	92
0,1	0,05 mM PGE_2	10 mM 5'AMP	63	59
0,05	0,05 mM PGE_2	10 mM 5'AMP	52	50
0,05	0,05 mM $PGF_{2\alpha}$	5 mM 5'AMP	56	56

4.8.5. Produkthemmung der Hinreaktion

Beide Enzyme, NAD-15HPGDH-(SC) und NAD-15HPGDH-(SM), werden durch die Produkte ihrer Hinreaktion, 15KPG und NADH, prinzipiell gleichartig gehemmt. Die erhaltenen Meßreihen wurden nach Lineweaver-Burk (130), Dixon (53), Hanes (85), Eadie-Hofstee (63,104) und Eisenthal & Cornish-Bowden (64) graphisch manuell ausgewertet. Der Übersichtlichkeit halber sind hier nur die Lineweaver-Burk-Diagramme gezeigt. Bei Verwendung von PGE_2 (0,1 mM) als nicht variablem Substrat ist die Hemmung des Produktes NADH gegenüber NAD bei beiden Enzymen kompetitiv. Die aus den Meßreihen resultierenden Geraden haben im Lineweaver-Burk- (Abb. 34, 37) wie im Eadie-Hofstee-Diagramm einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der Ordinate. Im Hanes-Diagramm sind die Geraden parallel, im Dixon-Diagramm schneiden sie sich im 2. Quadranten. Bei konstantem NAD (2 mM) hemmt NADH gegenüber PGE_2 nicht kompetitiv. Im Lineweaver-Burk- (Abb. 35, 38) wie im Dixon-Diagramm schneiden sich die aus den Meßreihen resultierenden Geraden im 2. Quadranten ($K_i < K_{ii}$). Bei NADH-Konzentrationen oberhalb 0,035 mM zeigt sich bei der NAD-15HPGDH-(SC) im Dixon-Diagramm (Abb. 36) eine Abweichung von der Linearität, die bei der NAD-15HPGDH-(SM) nicht auftritt. $15KPGE_2$ hemmt die Hinreaktion beider NAD-15HPGDH sowohl gegenüber PGE_2 bei festem NAD (2 mM) wie auch gegenüber NAD bei festem PGE_2 (0,1 mM) nicht-kompetitiv. Bei festem NAD schneiden sich die aus den Meßreihen resultierenden Geraden im Lineweaver-Burk- (Abb. 39, 41) wie im Dixon-Diagramm im 2. Quadranten oberhalb der Abszisse ($K_i < K_{ii}$). Im Hanes-Diagramm konvergieren die Geraden auf einen Schnittpunkt im 3. Quadranten, im Eadie-Hofstee-Diagramm auf einen gedachten Schnittpunkt im 2. Quadranten. Bei festem PGE_2 zeigen die aus den Meßreihen resultierenden Geraden für die NAD-15HPGDH-(SC) im Lineweaver-Burk- (Abb. 40) wie auch im Dixon-Diagramm einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der Abszisse ($K_i = K_{ii}$). Die anderen Diagramme entsprechen den oben beschriebenen. Die Diagramme der Reaktion mit NAD-15HPGDH zeigen bei festem

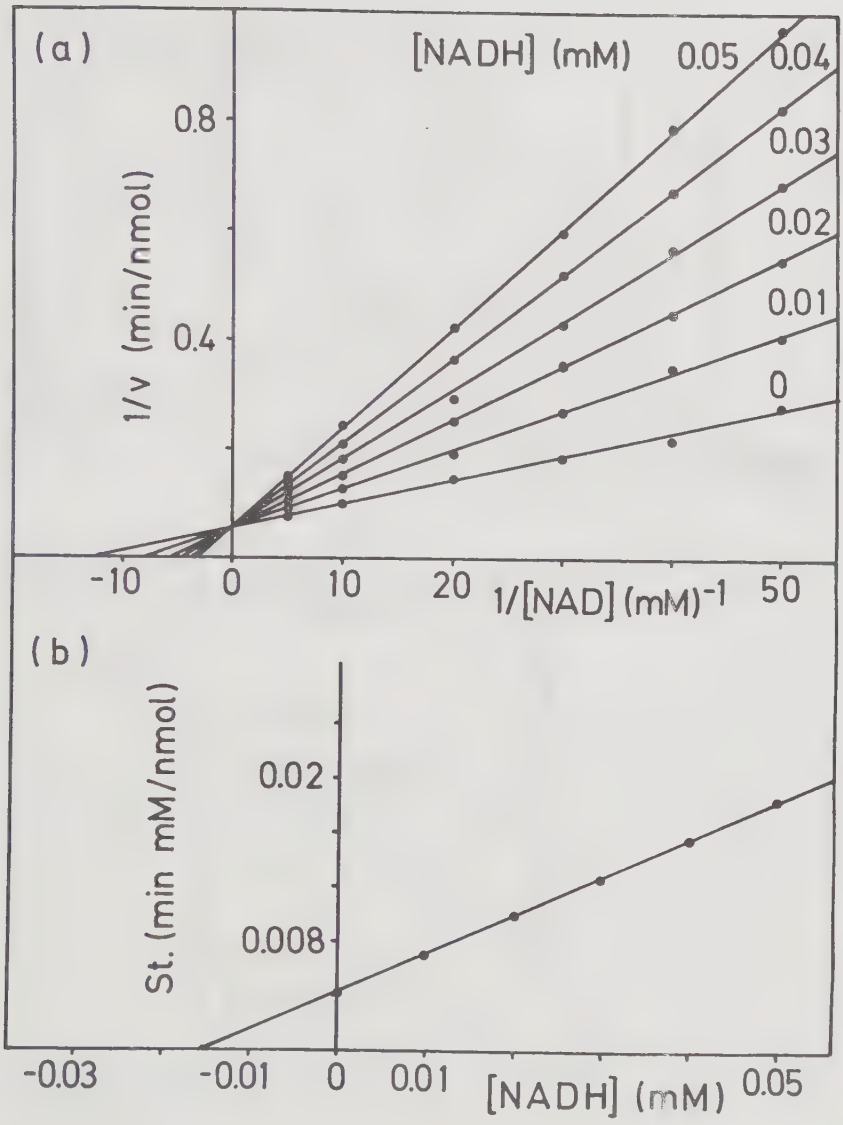


Abb. 34: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) mit NADH bei variablem NAD und festem PGE_2. Testbdgn.: Standardtest, 0,02 - 2 mM NAD, 0,1 mM PGE_2.

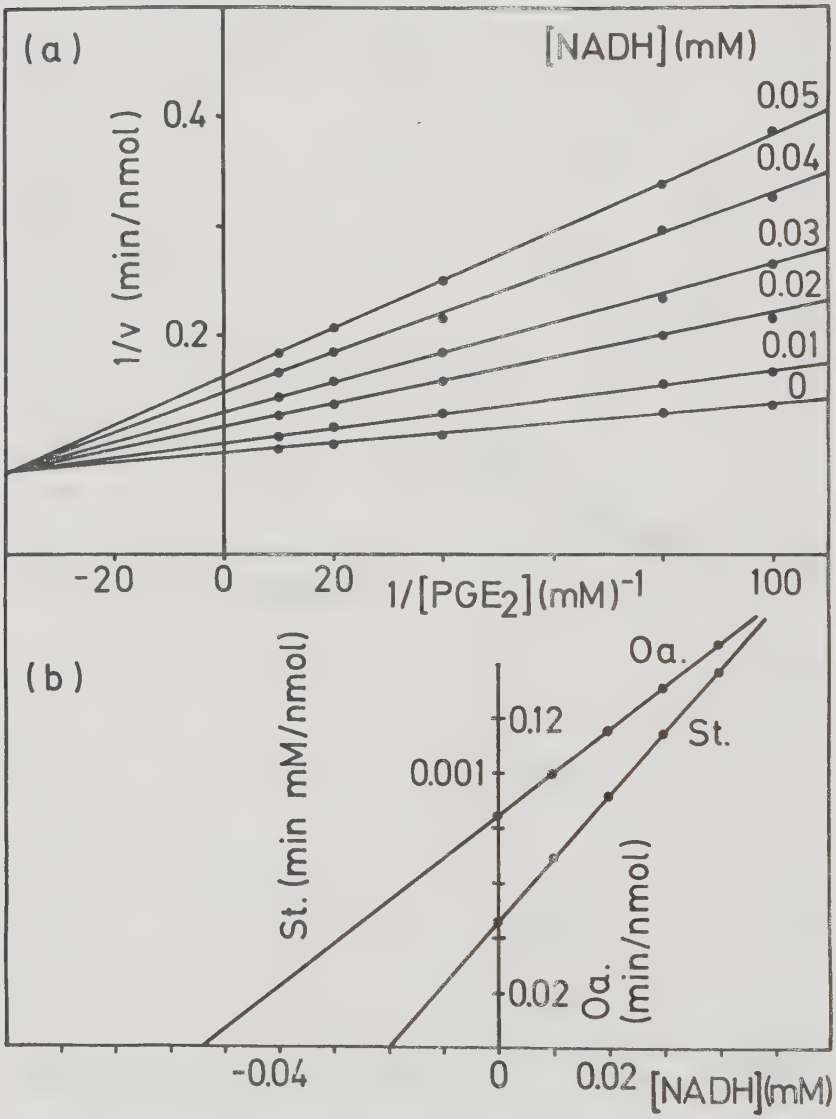


Abb. 35: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) mit NADH bei variablem PGE_2 und festem NAD. Testbdgn.: Standardtest, 0,001 - 0,1 mM PGE_2, 2 mM NAD.

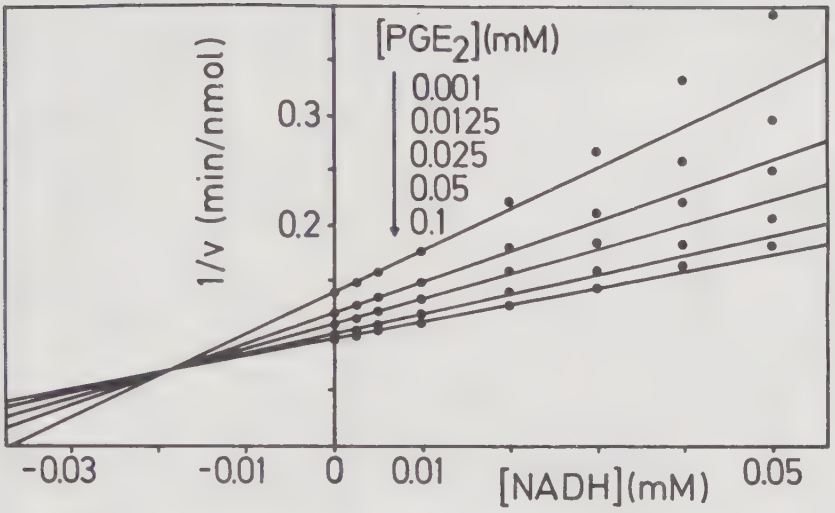


Abb. 36: Dixon-Diagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) mit NADH bei variablem PGE_2 und festem NAD. Testbdgn.: siehe Abb. 35.

PGE_2 ein Bild, wie es für $K_i < K_{ii}$ zu erwarten ist. Die in Tab. 16 dargestellten Hemmkonstanten sind Mittelwerte der aus allen Diagrammtypen ermittelten Werte.

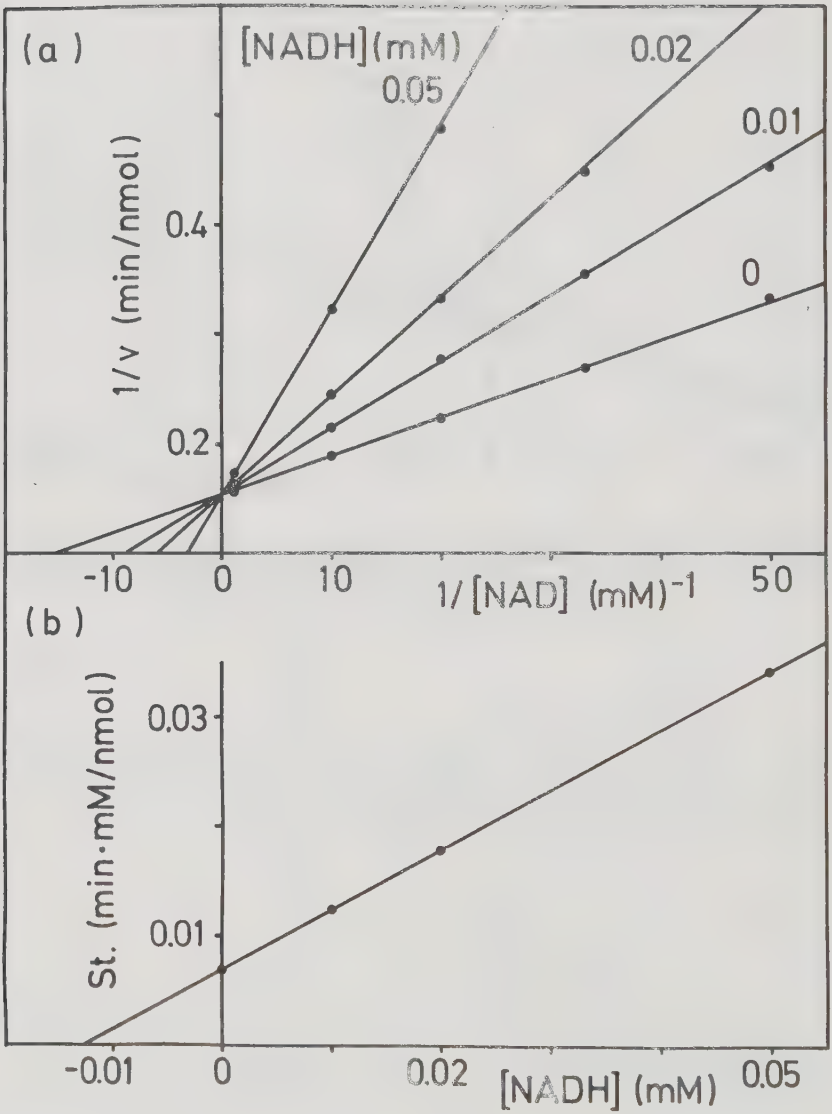


Abb. 37: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) mit NADH bei variablem NAD und festem PGE_2. Testbdgn.: Standardtest, 0,02 - 1 mM NAD, 0,05 mM PGE_2.

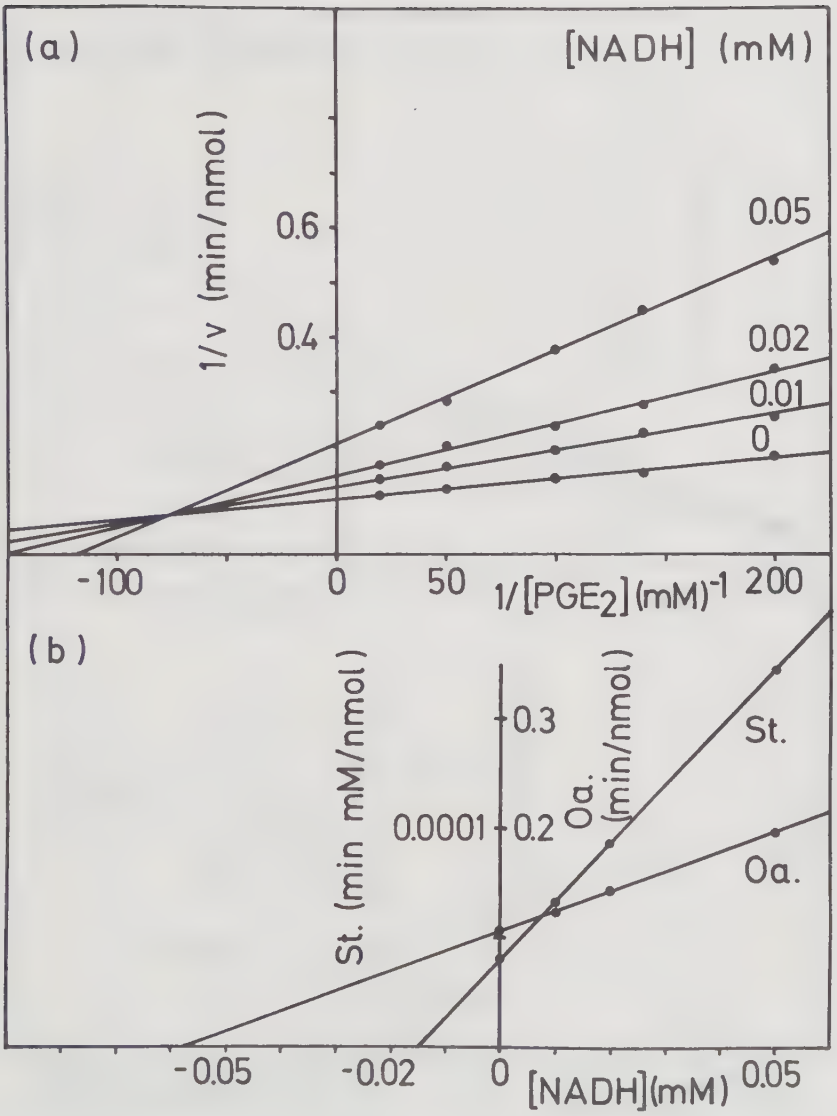


Abb. 38: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) mit NADH bei variablem PGE_2 und festem NAD. Testbdgn.: Standardtest, 0,005 - 0,05 mM PGE_2, 1 mM NAD.

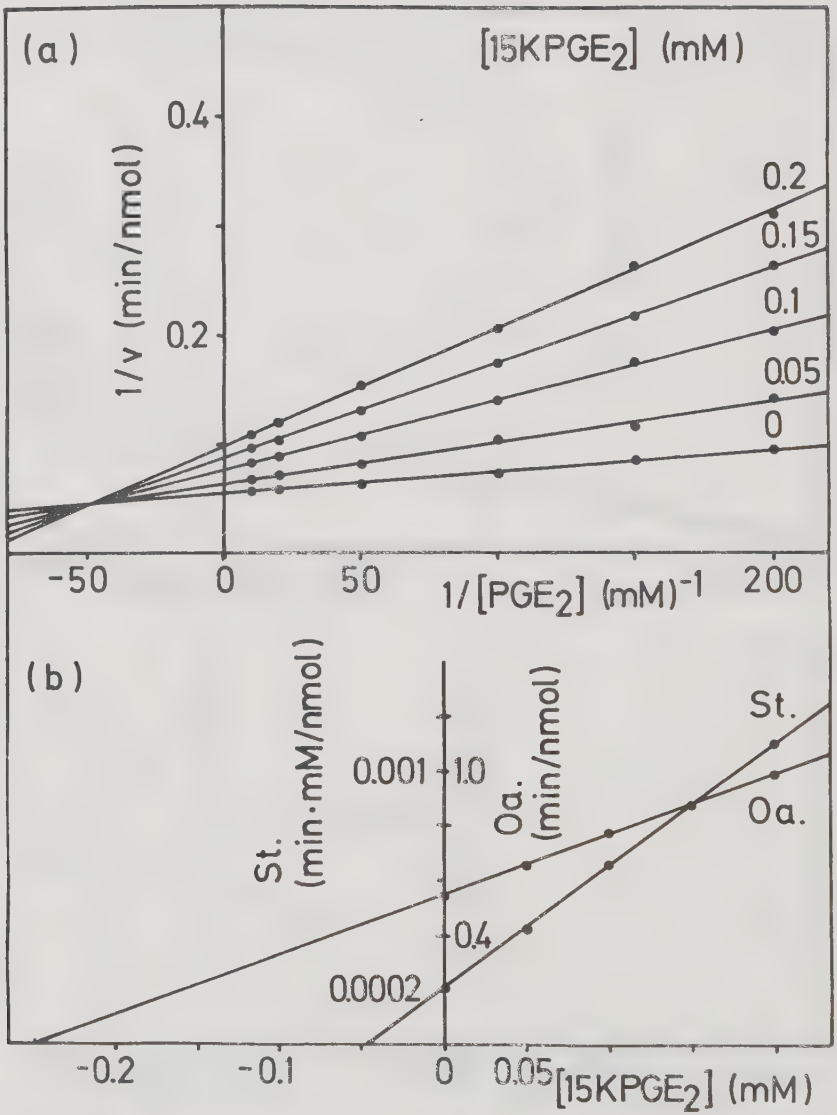


Abb. 39: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) mit 15KPGE$_2$ bei variablem PGE$_2$ und festem NAD. Testbdgn.: Standardtest, 0,005 - 0,1 mM PGE$_2$, 2 mM NAD.

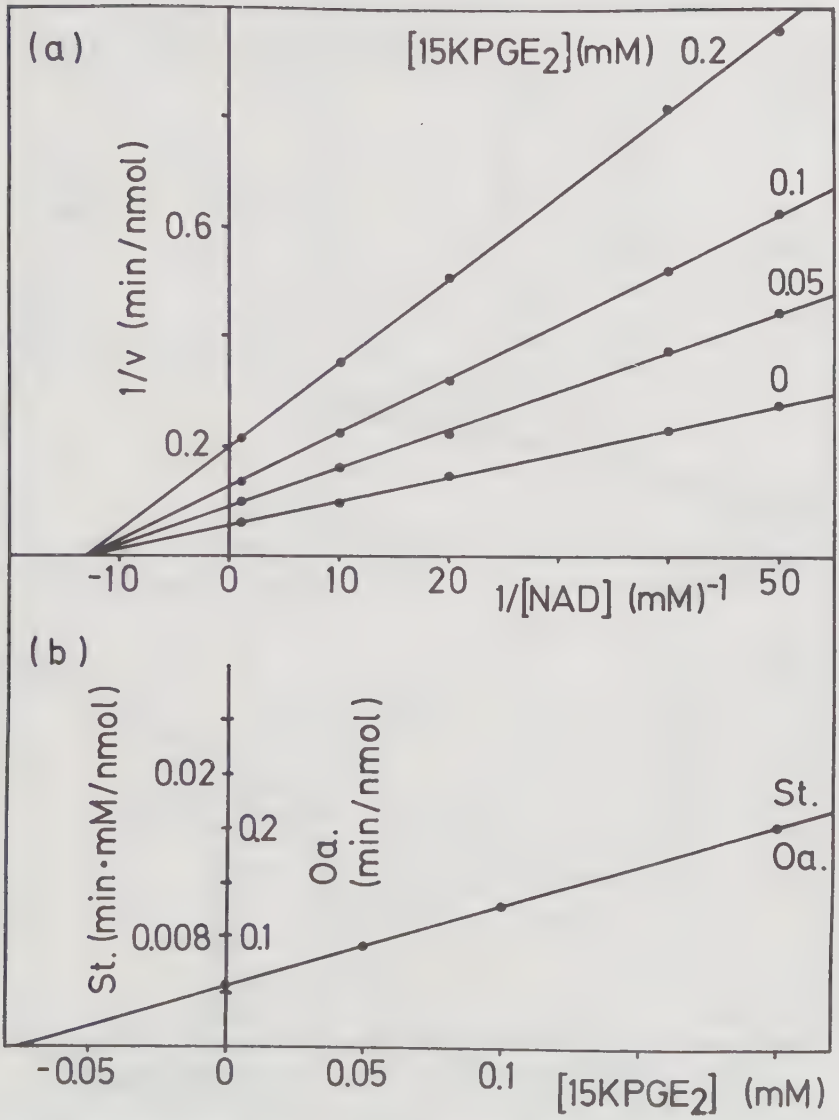


Abb. 40: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) mit 15KPGE$_2$ bei variablem NAD und festem PGE$_2$. Testbdgn.: Standardtest, 0,02 - 1 mM NAD, 0,1 mM PGE$_2$.

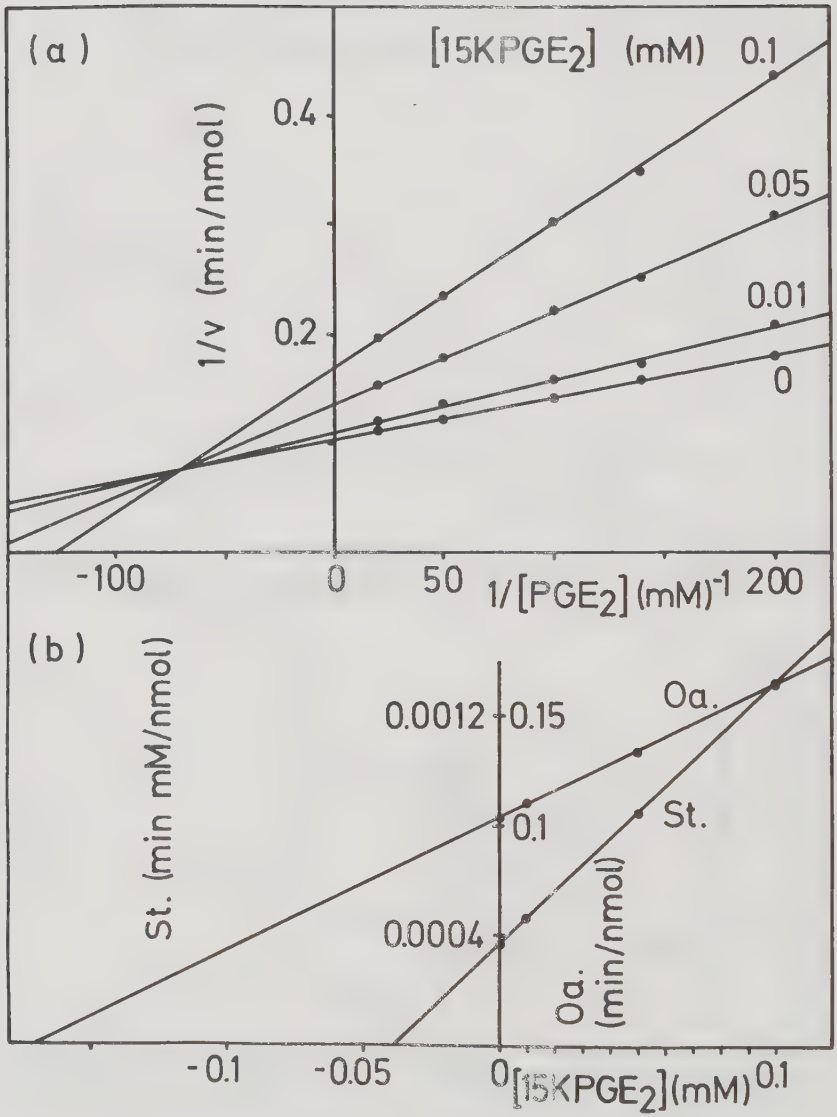


Abb. 41: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) mit 15KPGE$_2$ bei variablem PGE$_2$ und festem NAD. Testbdgn.: Standardtest, 0,005 - 0,05 mM PGE$_2$, 1 mM NAD.

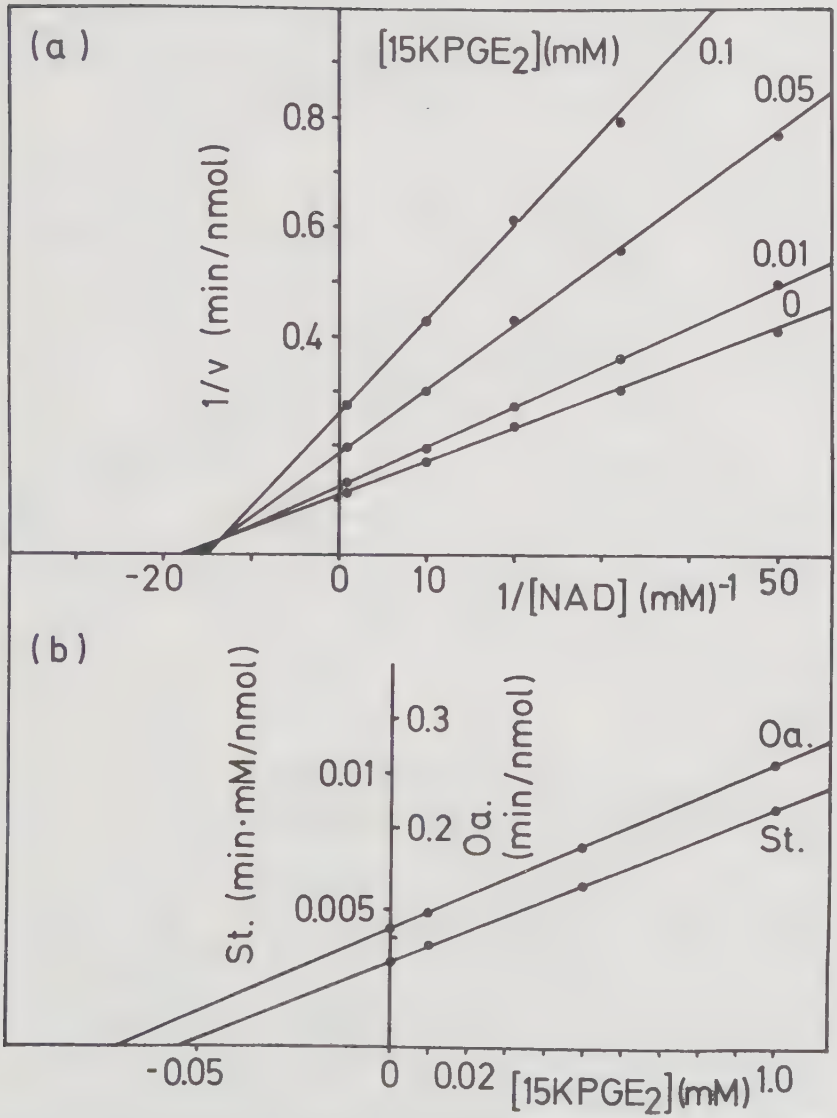


Abb. 42: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) mit $15KPGE_2$ bei variablem NAD und festem PGE_2. Testbdgn.: Standardtest, 0,002 - 1 mM NAD, 0,05 mM PGE_2.

Tab. 16: Inhibitionsmuster und Hemmkonstanten der Hemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla mit NADH bzw. $15KPGE_2$. Die Konstanten sind Mittelwerte der aus den in 3.4.14. beschriebenen Diagrammen ermittelten Werte. Testbdgn.: siehe Legenden der Abb. 34 bis Abb. 42.

Hemmendes Produkt	NAD variabel K_i (mM)	K_{ii}	NAD variabel K_i (mM)	K_{ii}	NAD-15HPGDH aus
NADH	kompetitiv		nicht-kompetitiv		
	0,016	0	0,019	0,054	(SC)
	0,013	0	0,014	0,058	(SM)
$15KPGE_2$	nicht-kompetitiv		nicht-kompetitiv		
	0,075	0,075	0,046	0,25	(SC)
	0,055	0,070	0,039	0,17	(SM)

4.9. KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR RÜCKREAKTION DER NAD-15HPGDH AUS SN-CORTEX UND SN-MEDULLA

Die Testbedingungen zur Messung der NADH/PG-Kreuzserien entsprachen denen der Hinreaktion (siehe 3.1.1.). Die erhaltenen Zeit/Umsatz-Kurven hatten, verglichen mit denen der Hinreaktion, einen relativ kurzen linearen Bereich. Die von Cleland (44) geforderten Voraussetzungen für Steady-State-Bedingungen waren jedoch in jedem Fall gegeben. Die NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla verhielten sich gleichartig. Für die Konzentrationsbereiche 0,005 mM - 0,05 mM NAD und 0,02 mM - 0,1 mM 15KPG waren alle Diagramme (siehe 3.4.14., Abb. 43-46) im Rahmen des Meßfehlers linear. Alle Diagramme zeigten die typischen Merkmale eines Ordered

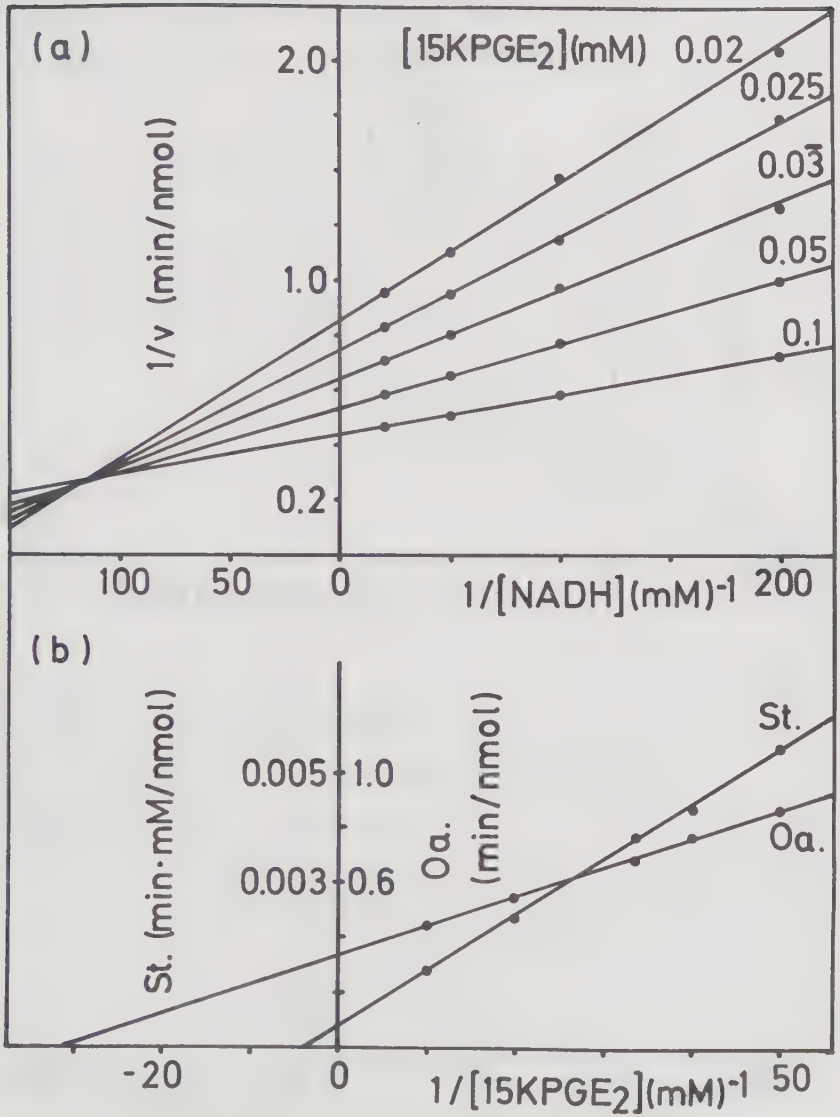


Abb. 43: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Rückreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei variablem NADH und festem $15KPGE_2$. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 0,005 - 0,05 mM NADH, 0,02 - 0,1 mM $15KPGE_2$, 37°C.

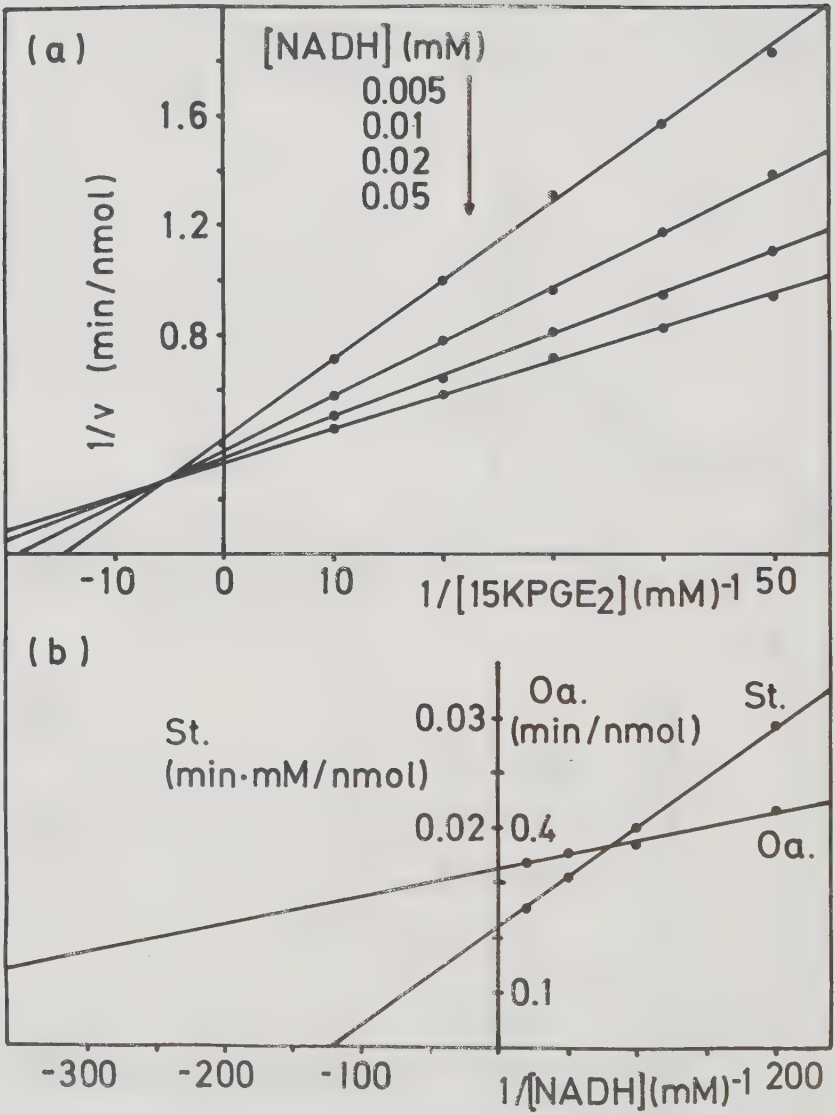


Abb. 44: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Rückreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei festem NADH und variablem 15KPGE$_2$. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 0,005 - 0,05 mM NAD, 0,02 - 0,1 mM 15KPGE$_2$, 37°C.

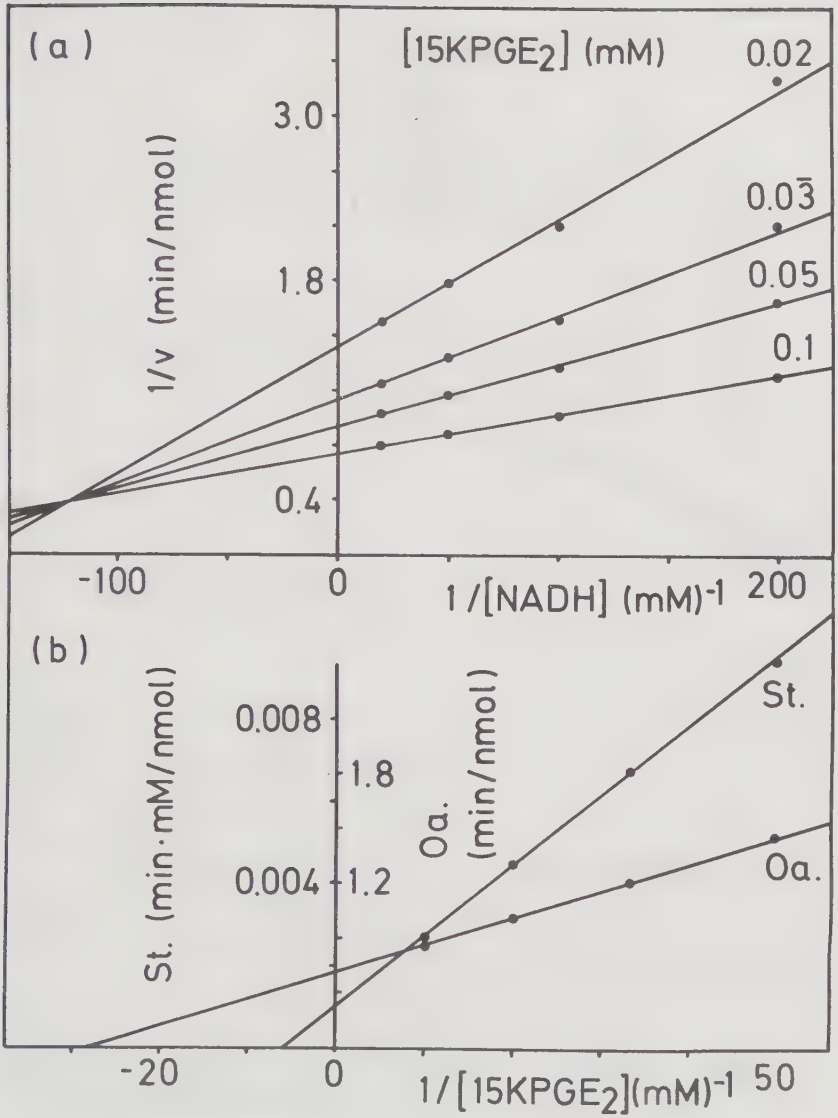


Abb. 45: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Rückreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) bei festem $15KPGE_2$ und variablem NADH. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 0,005 - 0,05 mM NADH, 0,02 - 0,1 mM $15KPGE_2$, 37°C.

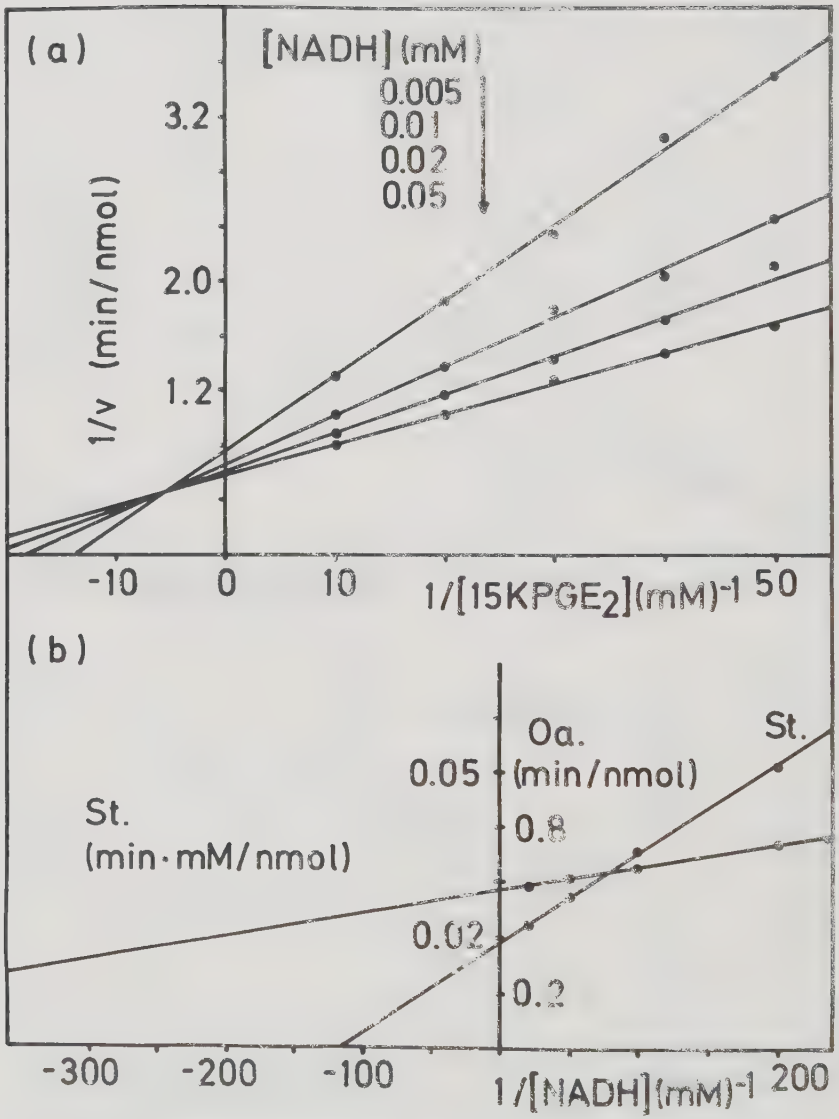


Abb. 46: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Rückreaktion der NAD-15HPGDH-(SM) bei festem NADH und variablem 15KPGE$_2$. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 0,005 - 0,05 mM NADH, 0,02 - 0,1 mM 15KPGE$_2$, 37°C.

Bi Bi-Mechanismus (130,24). Die kinetischen Konstanten der Rückreaktion für die Substrate NADH und $15KPGE_2$ sind in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17: Kinetische Konstanten der Rückreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla. Testbdgn.: siehe Abb. 43-46. Die kinetischen Konstanten sind Mittelwerte der aus den unter 3.4.14. beschriebenen Diagrammen ermittelten Werte.

NAD-15HPGDH aus	K_{NADH} (µM)	K_{iNADH} (µM)	K_{15KPGE_2} (µM)	$K_{i15KPGE_2}$ (µM)
SN-Cortex	1,5	8,3	32,2	219,4
SN-Medulla	1,2	8,6	35,1	178,3

Konzentrationen oberhalb 0,05 mM NADH führten unter den hier verwendeten Testbedingungen (100 mM TRAP, pH 7,4) zu einer deutlichen Substrathemmung der Rückreaktion. Für $15KPGE_2$ war erst bei Konzentrationen oberhalb 1 mM eine beginnende Substrathemmung festzustellen (Abb. 47, hier sind nur die Diagramme für NAD-15HPGDH aus SN-Cortex dargestellt).

In den Abb. 48 und Abb. 49 sind die Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Produktinhibition der Rückreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) durch NAD und PGE_2 dargestellt. Im verwendeten Konzentrationsbereich (siehe Legenden zu den Abb.) war die jeweilige Hemmung linear. NAD hemmt die Rückreaktion kompetitiv gegenüber NADH und PGE_2 nicht-kompetitiv gegenüber $15KPGE_2$. Das Produktinhibitionsmuster und die kinetischen Konstanten der Produkthemmung der Rückreaktion sind in Tab. 18 dargestellt.

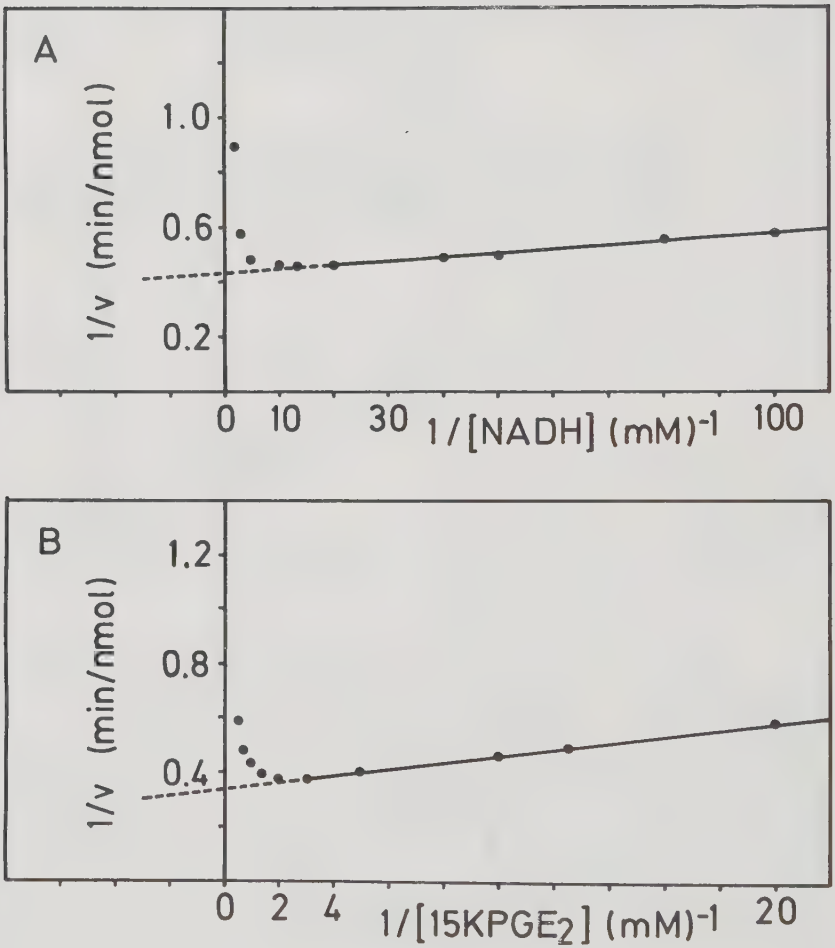


Abb. 47: Substrathemmung der Rückreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) bei hohen NADH- und 15KPGE$_2$-Konzentrationen. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 37°C. (A) 0,1 mM 15KPGE$_2$ fest, 0,01 - 0,5 mM NADH, (B) 0,05 mM NADH fest, 0,05 - 4,0 mM 15KPGE$_2$.

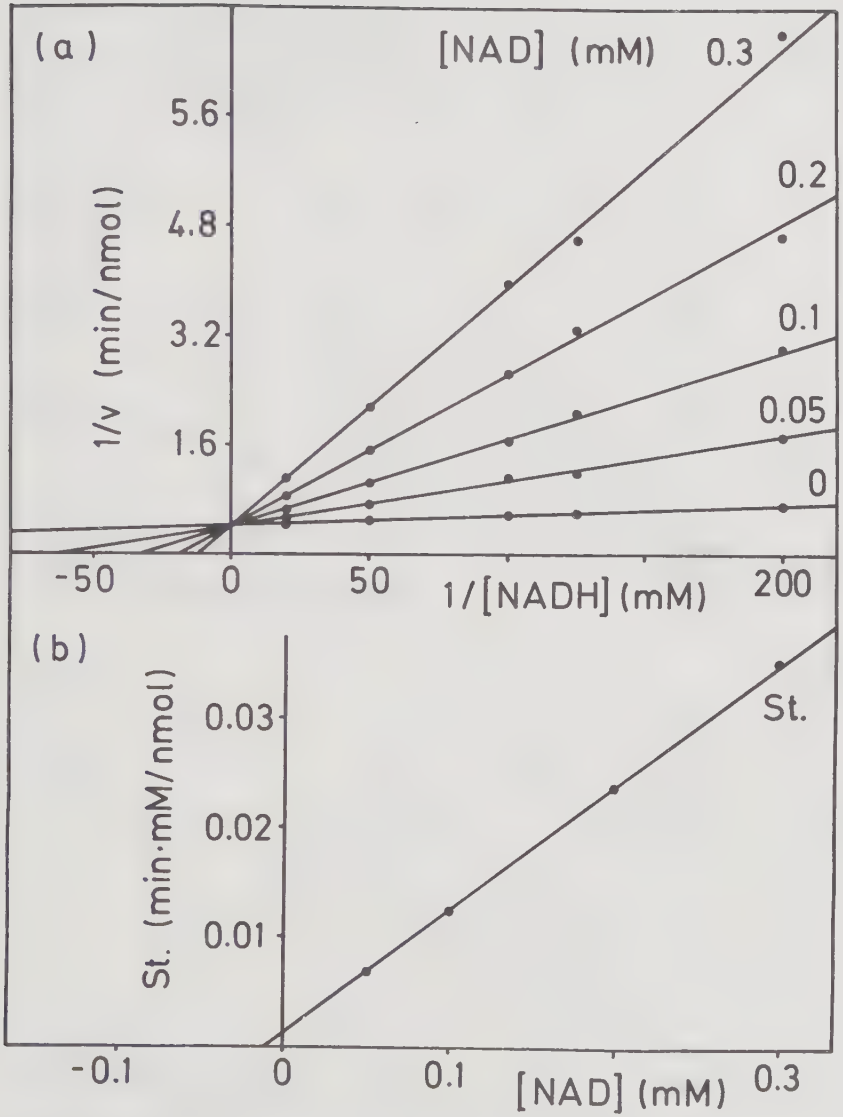


Abb. 48: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Rückreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) durch NAD. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 37°C, 0,1 mM 15KPGE$_2$, 0,005 - 0,05 mM NADH.

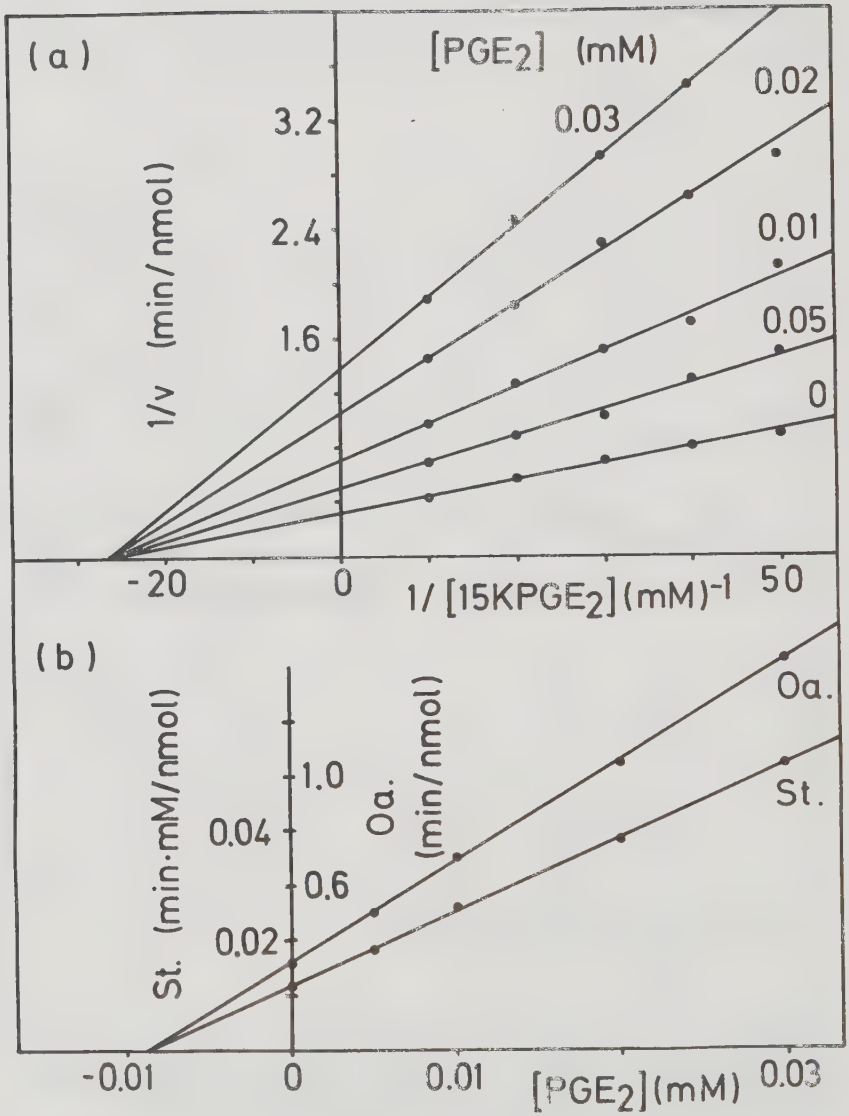


Abb. 49: Lineweaver-Burk (a) Primär- und (b) Sekundärdiagramm der Hemmung der Rückreaktion der NAD-15HPGDH-(SC) durch PGE_2. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 1 % Glycerin, 37°C, 0,05 mM NADH, 0,02 - 0,1 mM $15KPGE_2$.

Tab. 18: Inhibitionsmuster und Inhibitionskonstanten der Produkthemmung der Rückreaktion der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla. Testbdgn.: siehe Abb. 48 und Abb. 49. Die Inhibitionskonstanten sind die Mittelwerte der aus den unter 3.4.14. beschriebenen Diagrammen ermittelten Werte.

NAD-15HPGDH aus	NAD K_i (µM)		PGE_2 K_i bzw. K_{ii} (µM)		
SN-Cortex	13,3	kompetitiv		nicht-komp.	NADH
SN-Medulla	14,2	kompetitiv		nicht-komp.	
SN-Cortex		nicht-komp.	8,8	nicht-komp.	PGE_2
SN-Medulla		nicht-komp.	8,2	nicht-komp.	

Tab. 19: Vergleichende tabellarische Auflistung der kinetischen Konstanten der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex, SN-Medulla und Humanplacenta. Testbdgn.: 100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C. (SC) SN-Cortex, (SM) SN-Medulla, (Hu) Humanplacenta. Die Werte für das Humanplacentaenzym sind den Arbeiten von Rückrich (178) und Baier (16) entnommen.

A Kinetische Konstanten der Hinreaktion:

PG	K_{PG} (µM)	K_{iPG} (µM)	K_{NAD} (µM)	K_{iNAD} (µM)	NAD-15HPGDH aus
PGE_2	3,5	6,6	75	142	SC
	3,4	7,1	63	133	SM
	2,7	11,0	41	161	Hu
PGE_1	4,9	8,5	82	138	SC
	5,1	9,2	88	136	SM
	5,4	14,0	45	117	Hu
$PGF_{2\alpha}$	51	94	74	136	SC
	45	82	64	135	SM
	49	148	41	124	Hu
$PGF_{1\alpha}$	52	95	74	135	SC
	54	97	81	139	SM
	-	-	-	-	Hu
PGA_1	9,8	17	80	138	SC
	9,5	15	78	137	SM
	9,6	15	92	141	Hu
PGD_2	553	910	81	134	SC
	564	932	85	132	SM
	500+	-	-	-	Hu
PGD_1	593	961	81	132	SC
	590	959	79	134	SM
	-	-	-	-	Hu

+) K_m app.

Fortsetzung Teil A: (S-NAD als Substrat)

PG	K_{PG} (µM)	K_{iPG} (µM)	$K_{S\text{-}NAD}$ (µM)	$K_{iS\text{-}NAD}$ (µM)	NAD 15HPGDH aus
PGE_2	11,2	27,8	38,5	106	SC
	11,3	28	39	95	Hu

B Hemmkonstanten der Hinreaktion:

Inhibitor	PG variabel		NAD variabel		NAD 15HPGDH aus
	K_i (µM)	K_{ii} (µM)	K_i (µM)	K_{ii} (µM)	
PGB_1	21			192	SC
	22			243	SM
	18			173	Hu
NADH	19	54	16		SC
	14	58	13		SM
	13	34	10		Hu
$15KPGE_2$	46	250	75	75	SC
	39	170	55	70	SM
	36	205	-	-	Hu
$15KPGE_1$	32	351	-	-	SC
	29	358	-	-	SM
	33	360	-	-	Hu
$15KPGF_{2\alpha}$	510	3606	-	-	SC
	535	3494	-	-	SM
	450	3340	-	-	Hu
$15KPGF_{1\alpha}$	515	3652	-	-	SC
	542	3538	-	-	SM
	-	-	-	-	Hu

Fortsetzung Teil B:

Inhibitor	PG variabel K_i (µM)	PG variabel K_{ii} (µM)	NAD variabel K_i (µM)	NAD variabel K_{ii} (µM)	NAD 15HPGDH aus
$15KPGA_1$	241	685	-	-	SC
	254	672	-	-	SM
	-	-	-	-	Hu
$13,14H_2$-$15KPGE_2$	52	241	-	-	SC
	48	253	-	-	SM
	-	-	-	-	Hu
$13,14H_2$-$15KPGE_1$	49	261	-	-	SC
	48	265	-	-	SM
	-	-	-	-	Hu
$13,14H_2$-$15KPGF_{2\alpha}$	654	2621	-	-	SC
	623	2808	-	-	SM
	670	2650	-	-	Hu
$13,14H_2$-$15KPGF_{1\alpha}$	682	2737	-	-	SC
	645	2810	-	-	SM
	-	-	-	-	Hu

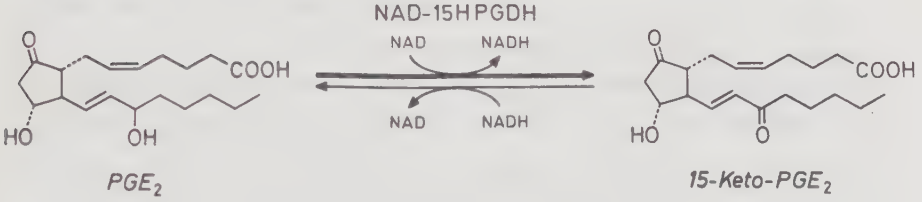
C Kinetische Konstanten der Rückreaktion:

PG	K_{15KPG} (µM)	K_{i15KPG} (µM)	K_{NADH} (µM)	K_{iNADH} (µM)	NAD-15HPGDH aus
$15KPGE_2$	32,2	219,4	1,5	8,3	SC
	35,1	178,3	1,2	8,6	SM
	35	210	1,3	9	Hu
	33	181	1,4	7,7	Hu
$15KPGF_{2\alpha}$	351	777	6,7	14,8	Hu
$13,14H_2$-$15KPGF_{2\alpha}$	400[+]	-	-	-	Hu

[+]) K_m app.

5. DISKUSSION

Die NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (NAD-15HPGDH, Typ I 15HPGDH; E.C. 1.1.1.141), katalysiert den ersten Schritt der Inaktivierung der PG der E-, F-, A-, I- und D-Reihe, die Oxidation der C15-Hydroxyfunktion zur Ketofunktion.



PGE_2 15-Keto-PGE_2

Die aus dieser Reaktion resultierenden 15-Keto-PG zeigen, abhängig von den verwendeten Testsystemen, maximal noch ein Fünftel der biologischen Aktivität der entsprechenden PG (9,13,38,45,31,47,49,117,122,123,81,228,216). Ihre Affinität zu PG-Rezeptoren ist gegenüber den entsprechenden PG um mindestens zwei Zehnerpotenzen verringert (72,122,166).

Die NAD-15HPGDH wurde in fast allen bislang untersuchten Säugetiergeweben gefunden (134). Die bei weitem höchsten Aktivitäten fanden sich jeweils in Lunge, Niere, Milz, Duodenum und Placenta. Die Verteilung auf diese Organe zeigt jedoch starke speziesspezifische Unterschiede. So fanden Sun et al. (203) bei Rhesusaffen die höchste 15HPGDH-Aktivität in der Lunge (ca. 240 mU/g Gewebe), gefolgt von Duodenum und Niere (ca. je 45 mU/g Gewebe) und der vaginalen Mucosa (ca. 30 mU/g Gewebe). In den Lungen und Nieren von Kaninchen und Ratten findet man ähnliche Verhältnisse (127,158, 156). Pace-Asciak et al. machten darüber hinaus die interessante Beobachtung, daß die 15HPGDH sowohl in der Lunge

(156) wie auch den Nieren (158) postnataler Ratten ein entwicklungsbedingtes Aktivitätsprofil zeigt. Bis zum 19. Tag nach der Geburt steigt die NAD-15HPGDH-Aktivität dramatisch an, in der Niere bis auf das 59-fache der bei erwachsenen Tieren gefundenen Aktivität. Erst nach etwa 40 Tagen ist die Aktivität wieder auf den Erwachsenenwert abgesunken. Diese Beobachtung ist besonders interessant im Hinblick auf die PG-Kontrolle, da die PG-Synthese in diesen Organen offenbar kein derartiges entwicklungsbedingtes Aktivitätsprofil zeigt. In Schweinen fanden Ängård et al. (10) die höchste NAD-15HPGDH-Aktivität in der Niere (ca. 82 mU/g Gewebe), gefolgt von Milz (ca. 75 mU/g Gewebe) und Lunge (ca. 50 mU/g Gewebe). Sehr hohe 15HPGDH-Aktivitäten wurden auch in Humanplacenta gefunden. Die Werte liegen etwa zwischen 100 - 150 mU/g Gewebe (16,174,184,178,114,189).

Die Verteilung der NAD-15HPGDH auf die einzelnen Kompartimente der Niere ist unabhängig von der speziesspezifischen Gesamtaktivität gleichartig. Bei Kaninchen fanden Larsson et al. (126) eine Verteilung der 15HPGDH-Aktivität auf Cortex, Medulla und Papilla wie 50:5:1, Dunn (59) fand bei Kaninchen wie auch Ratten eine Verteilung wie 100:10:1. In den UZ-Überständen von Schweinenierenpräparationen fanden Ängård et al. (10) ein Verhältnis der NAD-15HPGDH-Aktivität von Cortex zu Medulla wie 3:1. Lee et al. (128) fanden in ihren Präparationen ein Verhältnis von 11:1. In den eigenen Präparationen schlachtfrischer Schweinenieren wurden diese generellen Verhältnisse bestätigt. Aus Präparationen von 65 Schweinenieren ergab sich ein mittleres Verhältnis der Verteilung der NAD-15HPGDH, die 15HPGDH-Aktivität wurde in den jeweiligen UZ-Überständen gemessen, auf Cortex und Medulla wie 8,3:1 (siehe 4.1.2., Tab. 3). Einzeln betrachtet zeigten die Präparationen jedoch starke Schwankungen, die Einzelwerte reichten von 4,5:1 bis 12,5:1. Interessant war auch die Beobachtung, daß die Verhältnisse der NAD-15HPGDH-Aktivitäten, Cortex zu Medulla, nicht mit den entsprechenden Gewichtsverhältnissen korrelierten (siehe 4.1.1. und 4.1.2.).

So zeigten Präparationen mit C/M-Gewichtsverhältnissen von 10:1 C/M-Aktivitätsverhältnisse von 5:1 und weniger, wohingegen Präparationen mit C/M-Gewichtsverhältnissen von 6:1 oder 7:1 C/M-Aktivitätsverhältnisse von über 11:1 haben konnten. Diese Befunde sind allerdings schwer zu interpretieren, da die unbekannte aktuelle Körpersituation der Schweine, Ernährungslage, Schlachtstreß, Einsatz von Pharmaka, einen erheblichen Einfluß auf die NAD-15HPGDH-Konzentration haben kann. NAD-15HPGDH ist ein Enzym mit nur sehr kurzer biologischer Halbwertszeit (26). Seine de novo-Synthese ist offensichtlich stark von hormonalen und pharmakologischen Einflüssen abhängig (158,159,12,26).

Auf jeden Fall zeigen diese Ergebnisse, daß Schweinenierencortex mit NAD-15HPGDH-Aktivitäten von durchschnittlich 85 mU/g Gewebe (siehe 4.1.2.) bis ca. 125 mU/g Gewebe (10) eine der reichsten Quellen für dieses Enzym überhaupt ist. Bemerkenswert ist außerdem, daß die Verteilung der NAD-15HPGDH auf die einzelnen Kompartimente der Niere der Verteilung der PG-Syntheseenzyme direkt entgegengesetzt ist, was bei der Regulation des endogenen PG-Spiegels eine entscheidende Rolle spielen muß.

Bislang wurden nur wenige Isolierungen der NAD-15HPGDH aus Schweineniere beschrieben. 1974 berichten Tai et al. (205) von einer ersten Anreicherung der NAD-15HPGDH aus Schweineniere. Aus einem Nierengesamthomogenat konnten sie das Enzym über eine Ammoniumsulfatfällung, Sephadex G-100-, DEAE-Cellulose- und Hydroxylapatit-Chromatographie ca. 126-fach auf eine spezifische Aktivität von 93 mU/mg Protein anreichern. 1976 beschreibt die gleiche Gruppe in drei Arbeiten (206,207,208) eine modifizierte Anreicherung. Die NAD-15HPGDH wurde über eine Ammoniumsulfatfällung, Sephadex G-100- und anschließende Dextranblau-Sepharose-Chromatographie ca. 400-fach auf eine spezifische Aktivität von 653 mU/mg Protein (für alle drei Arbeiten wurde dieselbe Isolierung verwendet) angereichert. Lee et al. (128) unternahmen 1975 den

ersten Versuch, die NAD-15HPGDH aus Cortex und Medulla getrennt aufzuarbeiten. Über eine Ammoniumsulfatfällung und anschließende DEAE-Sephadex-Chromatographie erreichten sie bei einer ca. 15-fachen Anreicherung der Cortex-NAD-15HPGDH eine spezifische Aktivität von 0,163 mU/mg Protein.[+)] Die NAD-15HPGDH aus Medulla wurde zwar wie die aus Cortex chromatographiert, über die Anreicherung wird jedoch nicht berichtet. Aufgrund der wesentlich geringeren NAD-15HPGDH-Aktivität in Medulla, nur 1/11 der in Cortex gefundenen Aktivität, schließen Lee et al. nicht aus, daß es sich bei den Medulla-Aktivitäten um Kontaminationen aus Cortex handeln könnte.

Keine der oben beschriebenen Arbeiten geht über eine quantitative oder grob qualitative Betrachtung der NAD-15HPGDH hinaus. Aufgrund der offensichtlich wesentlichen Rolle der NAD-15HPGDH für die interne PG-Regulation der Niere erschien deshalb eine weitergehende Charakterisierung des Enzyms sinnvoll. Um mögliche Unterschiede im Charakter der 15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla aufzeigen zu können, wurden die beiden Kompartimente getrennt aufgearbeitet.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Isolierungen einer NAD-15HPGDH aus Schweinenierencortex und Schweinenierenmedulla sind die aus den Erfahrungen einer langen Reihe (mindestens 10 Isolierungen pro Kompartiment) hier nicht vorgestellter vorangegangener Anreicherungen heraus optimierten Isolierungen. Die NAD-15HPGDH aus SN-Cortex wurde, bezogen auf den 130 000 x g - Überstand, 587 000-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 711 000 mU/mg Protein angereichert. Die Ausbeute betrug dabei 16 % (siehe 4.2.5., Tab. 7). Unter gleichen chromatographischen Bedingungen wurde die NAD-

---

[+)] In der Originalarbeit wird die spez. Aktivität mit 1,63 U/mg Protein angegeben. Als Grundlage für die Berechnung der 15HPGDH-Aktivität diente jedoch die etwas unübliche Definition der Enzymeinheit, daß eine Unit den bei 37°C in 10 min gebildeten nMol Produkt entspricht.

15HPGDH aus SN-Medulla 489 000-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von über 121 000 mU/mg Protein angereichert. Die Ausbeute dieser Isolierung betrug 10,4 % (siehe 4.2.6., Tab. 8). Die spezifische Aktivität der Medulla-15HPGDH ist in dieser Darstellung sicher unterbewertet, da eine gesicherte Proteinbestimmung in dem Enzympool aufgrund seiner geringen Proteinkonzentration nicht mehr möglich war (siehe 3.4.8.5.). Betrachtet man den etwa gleichartigen Anreicherungsverlauf der beiden Präparationen, so ist anzunehmen, daß der tatsächliche Wert der spezifischen Aktivität des Medulla-Enzyms etwa dem des Cortex-Enzyms entspricht. Die beiden, mit Hilfe von modernen chromatographischen Methoden erzielten Anreicherungen stellen das bei weitem beste Ergebnis dar, das bislang mit NAD-15HPGDH, ganz gleich aus welchem Gewebe, erzielt wurde. Die höchsten bekannten Anreicherungen wurden bislang für das Humanplacenta-Enzym beschrieben. Baier (16) erreichte bei einer ca. 3 500-fachen Anreicherung eine spezifische Aktivität von 28 000 mU/mg Protein, Rückrich (178) bei einer etwa 10 000-fachen Anreicherung eine spezifische Aktivität von 43 000 mIU/mg Protein, Schärfe (184) bei einer fast 18 000-fachen Anreicherung eine spezifische Aktivität von über 107 000 mU/mg Protein.

Ausgangspunkt für das hier vorgestellte Chromatographieprinzip waren folgende Prämissen:

1) Fällungsreaktionen wie sie sonst in der Literatur verwendet werden (Ammoniumsulfatfällung, pH 5-Fällung, Chloroform/Ethanol-Fällung, Acetonfällung) sollten vermieden werden, da sie erstens fast immer hohe Verluste an Enzymaktivität bringen und zweitens, besonders wenn sie gleich zu Anfang einer Isolierung zur Einengung der UZ-Überstände verwendet werden, zu unkalkulierbaren Wechselwirkungen des Enzymproteins mit anderen Proteinen führen können, die unter Umständen über den gesamten Verlauf einer Isolierung nicht mehr rückgängig gemacht werden können. Zu nennen ist hier beispielsweise die Potenzierung hydrophober Wechselwirkungen über den Aussalzeffekt von Ammoniumsulfat (102). Auf diesen Effekt wird später noch genauer eingegangen.

2) Die einzelnen Chromatographieschritte sollten keine Wiederholungen des gleichen Trennprinzips mit unterschiedlichen Techniken darstellen, sondern jeweils ein für das Protein neues Auswahlkriterium einführen (Ionenaustauschchromatographie - Ladung, hydrophobe Chromatographie - hydrophobe Wechselwirkung, Gelfiltration - Molekülgröße, Affinitätschromatographie - Substratspezifität). Wenn überhaupt, ist nur so die zu einer Proteincharakterisierung notwendige spezifische Homogenität zu erlangen.
3) Die Chromatographiekette sollte so aufgebaut sein, daß zeitraubende, verlustreiche und teure Zwischenschritte wie Dialysen, Ultrafiltrationen und Pufferwechsel wegfallen. Die Chromatographiekette sollte automatisierbar und über den Labormaßstab hinaus brauchbar sein.
4) Die einzelnen Chromatographien sollten, ohne daß es zu einer Beeinträchtigung der gewünschten Trennleistung kommt, ökonomisch eingesetzt werden. Chromatographien, die viel Gelmaterial erfordern, namentlich zu Beginn einer Isolierung, sollten billig und leicht handhabbar sein. Teure Gelmaterialien sollten da eingesetzt werden, wo schon die Kapazitäten geringer Gelvolumina zur Bewältigung der Trennprobleme ausreichen.

In den beiden hier dargestellten Isolierungen konnten alle diese Vorstellungen ausreichend verwirklicht werden. Für die gesamte Isolierung, d.h. Homogenisierung und Äquilibrierung aller Säulen, konnte ein Puffersystem verwendet werden (100 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 20 % Glycerin). Aufgrund der ausreichenden Pufferkapazität dieses Systems konnte der UZ-Überstand ohne vorherige Dialyse direkt auf den Ionenaustauscher (DEAE-Sepharose Cl-6B) aufgetragen werden. Die Elution des Enzymproteins vom Ionenaustauscher über einen steigenden Salzgradienten schafft für die hydrophobe Chromatographie günstige Bedingungen, da hohe Ionenstärken neutraler Salze hydrophobe Wechselwirkungen begünstigen (102). Der DEAE-Enzympool konnte direkt auf das hydrophobe Material (Phenyl-Sepharose Cl-4B) aufgetragen werden. Die Elutionsbedingungen für hydrophobe Gele (niedrige Ionenstär-

ke) waren wiederum für die nachfolgende Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B (Auftrag bei niedrigen Ionenstärken, Elution bei hohen Ionenstärken) günstig. Die Blue-Sepharose brachte nun aufgrund ihrer hohen Spezifität für Nucleotid-abhängige Proteine erstens eine hohe Anreicherung des Enzymproteins und zweitens eine für die nachfolgende Gelfiltration ausreichende Konzentrierung des Enzympools, wodurch ein sonst notwendiger meist verlustreicher Einengungsschritt (Ammoniumsulfatfällung oder Ultrafiltration) vermieden werden konnte. Die Gelfiltration an Sephadex G-100, an dieser Stelle eingesetzt, brachte neben ihrer Trennleistung über ihren Entsalzungseffekt die für die nachfolgende Affinitätschromatographie an NAD-Agarose notwendigen definierten Mediumsbedingungen. Wie in Pilotversuchen gezeigt werden konnte, ist diese Chromatographiekette über Leitfähigkeitsmeßzellen und Magnetventile voll automatisierbar. Die Chromatographie an NAD-Agarose AGNAD^{TM} Typ 1 brachte, hier in beiden Fällen an letzter Stelle eingesetzt, bei beiden Isolierungen noch bemerkenswerte Anreicherungen (siehe 4.2.5.5., 4.2.6.5.). Bei dieser Anordnung war die Kapazität von nur 2 ml des sehr teuren Gelmaterials selbst für Isolierungen mit mehr als 1 kg Ausgangsmaterial (Cortex- oder Medullagewebe) ausreichend.

Die DEAE-Sepharose-Pools der SN-Cortex und SN-Medulla Präparation zeigten bei verschiedenen Geldichten in analytischen Disk-Elektrophoresen (siehe 3.4.9., 4.3.; Abb. 12) unterschiedliche Proteinmuster. Auch während der weiteren Anreicherung blieben die Proteinmuster (z.B. im Phenyl-Sepharose-Pool oder Blue-Sepharose-Pool) qualitativ und quantitativ andersartig. Der Reinigungserfolg der einzelnen Chromatographieschritte war jedoch am Abnehmen verschiedener Proteinbanden deutlich zu verfolgen. Die NAD-Agarose-Pools beider Isolierungen zeigten keine Proteinbanden mehr. Auch die in der Aktivitätsanfärbung deutliche Bande der NAD-15HPGDH ließ sich, auch bei höheren Konzentrationen des En-

zympools, nicht mehr als Proteinbande nachweisen. Die hohen spezifischen Aktivitäten der beiden Enzympools (siehe Tab. 7 bzw. Tab. 8) könnten in Anbetracht dessen dazu verleiten, von einer Anreicherung bis zur Homogenität der jeweiligen NAD-15HPGDH zu sprechen. Unter Berücksichtigung der Schwierigkeiten bei der Analytik derart geringer Proteinkonzentrationen (nur wenige ng Protein im Auftrag) scheint diese Aussage jedoch gewagt.

Aktivitätsanfärbungen mit NAD und PGE_2 zeigten in allen Enzympools nur eine schmale Bande. Diese Banden korrespondierten mit der Aktivitätsanfärbung einer nach dem gleichen Isolierungsschema gereinigten NAD-15HPGDH hoher spezifischer Aktivität aus Humanplacenta (siehe Abb. 12). Offensichtlich verhalten sich die NAD-15HPGDH aus SN-Cortex, SN-Medulla und Humanplacenta diskelektrophoretisch gleich. Die Tatsache, daß bei den Affinitätsanfärbungen aller Enzympools sowohl der aus Schweinenieren- wie auch der aus Humanplacentapräparationen nur eine Aktivitätsbande auftrat, und daß in den Durchläufen aller Säulen, bei der hier dargestellten Präparationsart, über Inkubationstests mit NAD und 1-^{14}C-PGE_2 keine NAD-15HPGDH-Aktivität nachgewiesen werden konnte, läßt darauf schließen, daß die NAD-15HPGDH in SN-Cortex, SN-Medulla wie auch Humanplacenta nicht in multiplen Formen existiert.

In der Literatur stellt sich das Problem möglicher Isoenzyme der NAD-15HPGDH kontrovers dar. Thaler-Dao et al. (212), Schlegel et al. (188,189) und Hassid & Levine (88) konnten aufgrund der Ergebnisse ihrer Disk-Elektrophoresen oder isoelektrischen Fokussierung mit NAD-15HPGDH aus Humanplacenta oder auch Hühnerniere die Existenz von Isoenzymen nicht ausschließen. Jung et al. (188), Braithwaite & Jarabak (33), Schärfe (184) und Rückrich (178) hatten während ihrer Arbeiten über das Humanplacentaenzym keine Hinweise auf Isoenzyme. Betrachtet man die Isolierungsschemata dieser oben zitierten Anreicherungen einmal genauer, so ergibt sich ein interessanter Aspekt. Mit einer Ausnahme, Schärfe (184), ge-

hen der eigentlichen chromatographischen Trennung Proteinfällungen (Ammoniumsulfatfällung) im UZ-Überstand der jeweiligen Gewebepräparation voraus. In den unter 3.4.3. beschriebenen Versuchen konnte nun nachgewiesen werden, daß die NAD-15HPGDH aus Humanplacenta, wie auch die aus SN-Cortex und SN-Medulla nach Ammoniumsulfatfällungen ein verändertes chromatographisches Verhalten zeigen. Wird der UZ-Überstand direkt auf ein DEAE-Ionenaustauschgel (dies ist der erste Chromatographieschritt in allen oben zitierten Arbeiten) genügender Kapazität aufgetragen, so bindet die NAD-15HPGDH quantitativ an das Gelmaterial. In dem Durchlauf der Säule kann weder mit optischen Methoden, noch über Inkubationstests mit NAD und 1-^{14}C-PGE_2 NAD-15HPGDH-Aktivität nachgewiesen werden (siehe 4.2.1., Abb. 3). Wird mit dem UZ-Überstand zunächst eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, der Niederschlag gegen den Äquilibrierungspuffer dialysiert (>10 mM KP, pH 7 - 7,4, 0 - 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, DTE oder ME) und dann erst einer DEAE-Ionenaustauschchromatographie unterzogen, so treten erstens meist hohe Verluste an NAD-15HPGDH-Aktivität auf, zweitens bindet die NAD-15HPGDH nicht vollständig an das Gelmaterial. Im Durchlauf der Säule sind mindestens 1 % der Gesamtaktivität nachzuweisen (siehe 4.2.1., Tab. 4). Die in der Arbeit von Lee et al. (128) dargestellten DEAE-Sephadexchromatographien mit NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla geben unbeabsichtigt eine klare Dokumentation dieses Phänomens. Trotz ausreichender Kapazität ihrer Säulen und optimaler chromatographischer Bedingungen finden sie im Durchlauf der DEAE-Sephadex-Säule, sowohl der SN-Cortex- wie auch der SN-Medulla-Präparation NAD-15HPGDH-Aktivität. Diesen Befund lassen sie jedoch unberücksichtigt.

Auch die von Bardsley & Crabbe (18) anschließend an eine Chloroform/Ethanol-Fällung und Ammoniumsulfatfällung durchgeführte Chromatographie an DEAE-Sephadex zeigt ein verändertes Verhalten. Die Elution der NAD-15HPGDH erfolgte schon bei vergleichsweise sehr geringen Ionenstärken (ca. 50 mM KP, pH 7,4). Üblicherweise erfolgt bei pH 7,4 auch noch

oberhalb 100 mM KP eine quantitative Bindung der NAD-15HPGDH an DEAE-Ionenaustauschergele (184,178,118,33,188,189,88). Dieses veränderte Elutionsverhalten kann als ein Indiz für eine konformative Veränderung des Enzymproteins angesehen werden, aus der sich unter anderem der andersartige von Bardsley & Crabbe dargebotene kinetische Mechanismus der NAD-15HPGDH-Reaktion erklären lassen kann (siehe dazu auch 4.7.). Die von Nagasawa et al. (144) anschließend an eine Ammoniumsulfatfällung mit nachfolgender Acetonfraktionierung und Lyophilisation der NAD-15HPGDH durchgeführte Chromatographie an DEAE-Cellulose zeigt ebenfalls eine frühzeitige Elution der NAD-15HPGDH (bei ca. 100 mM KP, pH 7,2). Die durch das veränderte Elutionsverhalten angezeigte konformative Veränderung des Enzymproteins ist möglicherweise eine Erklärung für den späteren Erfolg ihrer Affinitätschromatographien an PG-Sepharosen (siehe dazu auch S. 127 ff).

Bei dieser offensichtlich stark veränderten Charakteristik der NAD-15HPGDH nach Proteinfällungsreaktionen ist anzunehmen, daß zumindest auch Teile der an den Ionenaustauscher gebundenen NAD-15HPGDH derart verändert sind, daß sie das Vorhandensein von Isoenzymen vortäuschen können. Bemerkenswert ist nun, daß alle Arbeitsgruppen, die über mögliche multiple Formen der NAD-15HPGDH berichten (212,188,189,88), zu keinem Zeitpunkt ihrer Anreicherungen Bedingungen schaffen, die dazu in der Lage wären, z.B. hydrophobe Wechselwirkungen, die über den Aussalzeffekt von Ammoniumsulfat auftreten können (102), wieder zu lösen. Alle Arbeitsgruppen, die keine Hinweise auf multiple Formen der NAD-15HPGDH erhalten, haben hingegen entweder hydrophobe Chromatographien selbst in ihr Anreicherungsschema aufgenommen (16, 184,178) oder während ihrer Anreicherung unbewußt Bedingungen geschaffen, die dazu in der Lage sind, hydrophobe Wechselwirkungen zu lösen. So dialysierten Braithwaite & Jarabak (33) ihre Ammoniumsulfatpräzipitationen einer Humanplacentapräparation aus technischen Gründen zunächst gegen 5 mM KP, pH 7,0, 50 % Glycerin, 1 mM EDTA und lagerten sie anschließend bei -20°C, bevor sie sie auf den für die nach-

folgende DEAE-Ionenaustauschchromatographie verwendeten Puffer umdialysierten. Die niedrige Ionenstärke (5 mM KP), die hohe Glycerin-Konzentration (50 %) und die niedrige Temperatur (-20°C) reichen, wie später gezeigt wird, aus, um selbst starke hydrophobe Wechselwirkungen, die die NAD-15HPGDH mit anderen Strukturen eingehen kann, zu lösen.

Aufgrund dieser Betrachtung erscheint es als gesichert, daß die NAD-15HPGDH zumindest in Humanplacenta, SN-Cortex und SN-Medulla nicht in multiplen Formen auftritt. Die in den anderen Präparationen gefundenen "Isoenzyme" sind als Artefakte der den chromatographischen Trennungen vorausgegangenen Proteinfällungen zu betrachten.

Abhängig von den verwendeten Bestimmungsmethoden zeigen die Molekulargewichtsangaben für NAD-15HPGDH unterschiedlicher Säugetiergewebe große Unterschiede. Die Angaben umfassen Molekulargewichte von 20 000 - 70 000. Die zusammenfassende Arbeit von Hansen (86) gibt einen Überblick über die meisten bis heute veröffentlichten Ergebnisse. Bei der Betrachtung dieser tabellarischen Auflistung fällt ins Auge, daß die für ein Gewebe einer Spezies gefundenen Werte untereinander stärker differieren, als die Werte unterschiedlicher Gewebe und Spezies zueinander. Diese Beobachtung kann ebenso bei einem Vergleich der von unterschiedlichen Gruppen referierten kinetischen Daten der NAD-15HPGDH gemacht werden (86, siehe auch Tab. 19). Aus diesem Grunde liegt die Vermutung nahe, daß sich die Molekulargewichte dieses Enzyms unabhängig von seiner Herkunft gar nicht oder nur geringfügig unterscheiden. Die dargestellten großen Differenzen sind wohl eher auf das Fehlen einer adäquaten Bestimmungsmethode zurückzuführen.

Die meisten zur Molekulargewichtsbestimmung verwendeten Methoden sind in ihren Auswahlkriterien nicht eindeutig. Gelfiltrations-, wie auch Zentrifugationstechniken unterscheiden nach Molekülgröße oder Dichte wie auch Sphärik des zu analysierenden Moleküls. Jedes biologische Makromolekül hat

aufgrund seiner spezifischen Aufgabe im Organismus eine spezifische Konformation, so daß bei gleichem, aus der Primärstruktur theoretisch ableitbarem Molekulargewicht, erhebliche Unterschiede in der Molekülgeometrie und Dichte auftreten können, die natürlich in obigen Bestimmungsmethoden ihren Ausdruck finden können. Ein markantes Beispiel hierfür ist der signifikante Dichteunterschied von Einstrang- und Zweistrangnucleinsäuren gleicher molekularer Zusammensetzung. Ein wichtiges Kriterium für den Erfolg obiger Techniken wäre also, daß Molekülgeometrie und Dichte der Eichproteine mit der des zu untersuchenden Proteins vergleichbar sind (7,137). Da diese Parameter jedoch meist weitgehend unbekannt sind, liegt eine Falscheinschätzung des effektiven Molekulargewichts nahe.

Individuelle Erfordernisse bringen eine weitere interpretatorische Unsicherheit. Wie im Abschnitt 4.2.4. gezeigt, ist NAD-15HPGDH nur in Gegenwart ausreichender Glycerinkonzentrationen (>20 %) hinlänglich stabil. So war die von Jung et al. (118) in Gegenwart von nur 10 % Glycerin durchgeführte Gelfiltration mit in der Hauptsache Dehydrogenasen als Eichproteinen vorwiegend durch den drastischen Verlust an Enzymaktivität der NAD-15HPGDH gekennzeichnet. Das während dieser Arbeit gefundene niedrige Molekulargewicht (29 000 - 35 000) führte unter anderem dazu, daß für die NAD-15HPGDH aus Humanplacenta auch ein Aufbau aus Untereinheiten diskutiert wurde (118,188), der durch ausreichende Glycerinkonzentrationen vor der Dissoziation bewahrt werden könnte (178). Die Diskussion, ob Untereinheiten existieren oder nicht, erscheint jedoch bei der geringen Bestimmungsgenauigkeit der zur Verfügung stehenden Techniken als relativ sinnlos.

SDS-Elektrophoresen haben den Vorteil, daß bei allen Proteinen von gleicher Molekülform ausgegangen werden kann (137,171). Der Nachteil dieser Technik liegt jedoch darin, daß keine spezifischen Aktivitätsanfärbungen mehr durchgeführt werden können. Das heißt, für eine Molekulargewichts-

bestimmung mit dieser Technik muß das zu untersuchende Protein absolut sauber und vor allem in genügender Menge vorhanden sein. Wie die analytischen Disk-Elektrophoresen mit hochreiner NAD-15HPGDH hier (siehe 4.3., Abb. 12) wie auch in anderen Arbeiten (184,178) gezeigt haben, ist die NAD-15HPGDH selbst bei hoher Aktivität auf den Gelen analytisch nicht mehr als Protein nachzuweisen. Selbst nach Konzentrierungsversuchen und großem Auftragsvolumen war die NAD-15HPGDH-Konzentration nie für eine Proteinanfärbung ausreichend. Die über SDS-Elektrophoresen durchgeführten Molekulargewichtsbestimmungen mit weniger hoch angereicherter NAD-15HPGDH aus Humanplacenta (33,212) sind deshalb mit starken Vorbehalten zu betrachten.

Das Molekulargewicht von NAD-15HPGDH aus Schweineniere ist bislang noch nicht beschrieben worden. Aufgrund der oben aufgezeigten Schwierigkeiten wurde auf einen weiteren Versuch zur Bestimmung des wahren Molekulargewichts verzichtet. Die hier durchgeführten Untersuchungen dienten vielmehr dem Zweck aufzuzeigen, inwieweit die Molekulargewichte der NAD-15HPGDH auch unterschiedlicher Herkunft übereinstimmen. Aus diesem Grunde wurden streng die Versuchsbedingungen reproduziert, die Rückrich (178) zur Bestimmung des Molekulargewichts seines hochreinen Humanplacentaenzyms verwendet hat (siehe 3.4.10.). Das Ergebnis war eindeutig. Die Gelfiltration an Sephadex G-100 ergab für das Placentaenzym (hier nicht gezeigt) wie auch für NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla (siehe 4.4., Abb. 13) im Rahmen der Bestimmungsgenauigkeit gleiche scheinbare Molekulargewichte. Der Wert für das Placentaenzym war 51 000, der für das Cortexenzym 51 000, der für das Medullaenzym 50 000. Rückrich (178) fand unter diesen Bedingungen für das Humanplacentaenzym ein scheinbares Molekulargewicht von 52 000. Auch wenn diese Werte, aufgrund der oben angeführten Schwierigkeiten, nicht absolut stimmen mögen, so ist doch aufgrund der einheitlichen Versuchsbedingungen anzunehmen, daß sie relativ stimmen. Dies wäre ein weiteres deutliches Zeichen dafür, wie wenig sich die NAD-15HPGDH auch unterschiedlicher Gewebe- und Speziesherkunft voneinander unterscheiden.

In den unter 3.4.4. beschriebenen Versuchen wurde das Bindungsverhalten von NAD-15HPGDH aus SN-Cortex, SN-Medulla und Humanplacenta gegenüber den hydrophoben Gelen Phenyl-Sepharose Cl-4B und Octyl-Sepharose Cl-4B untersucht. Beide Gele tragen keine geladenen Gruppen, die hydrophoben Reste sind über Etherbrücken an den Träger gebunden (Angaben des Herstellers).

Morris (143) beschreibt, daß nur dann eine hydrophobe Chromatographie (genauer: "hydrophobic interaction chromatography") vorliegt, wenn:

1. Die stationäre Phase hydrophobe Gruppen trägt,
2. der Retentionsvorgang einen negativen Temperaturkoeffizienten hat, die gelösten Stoffe also bei hoher Temperatur fester binden als bei niedriger Temperatur, d.h. die freie Bindungsenergie mehr entropischer als enthalpischer Natur ist und
3. die Bindung bei relativ hohen und die Elution bei niedrigeren Salzkonzentrationen geschieht. Alle drei Kriterien müssen gleichzeitg erfüllt sein.

Bei einer Salzkonzentration von 100 mM KP und Temperaturen zwischen $4^{o}C$ und $10^{o}C$ wurden alle drei Enzyme quantitativ an die Phenyl-Sepharose gebunden. Generell war die Bindung umso fester, je höher die Salzkonzentration (höhere KP-Konzentrationen oder Zusatz von Ammoniumsulfat festigen die Bindung) und die Temperatur waren. Bei $10^{o}C$ war die Bindung selbst durch Zusatz von 0,1 % Triton X-100, einem nicht-ionischen Detergenz, nicht zu lösen. Nur wenn die Salzkonzentration, wie auch die Temperatur, drastisch gesenkt wurden (1 mM KP, $-20^{o}C$), konnten die NAD-15HPGDH von dem hydrophoben Gel eluiert werden. Die Veränderung nur eines Parameters war in keinem Falle ausreichend. Bei niedrigen Salzkonzentrationen (0 - 5 mM KP) und $4^{o}C$, der üblichen Kühlraumtemperatur, konnten die NAD-15HPGDH aus SN-Medulla und Humanplacenta nur eluiert werden, wenn die Glycerinkonzentration der mobilen Phase auf 50 % erhöht wurde, d.h. die Polarität dieser Phase stark verändert wurde (173). Die NAD-

15HPGDH aus SN-Cortex konnte selbst unter diesen Bedingungen nur durch Zusatz von Detergenz (0,1 % Triton X-100) oder Senken der Temperatur auf -20°C quantitativ eluiert werden (siehe Tab. 5). Die für die Elution erforderliche hohe Glycerinkonzentration hat hier den Vorteil, daß die bei geringen Salzkonzentrationen labilisierte NAD-15HPGDH stabilisiert wird (siehe dazu 4.2.4., Tab. 6).

Die Bindung der drei NAD-15HPGDH an Octyl-Sepharose war generell fester als an Phenyl-Sepharose. Dies war auch zu erwarten, da Octyl-Reste zu stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen in der Lage sind als Phenyl-Reste (192,173). Selbst bei niedriger Salzkonzentration, niedriger Temperatur und hoher Glycerinkonzentration gelang die Elution nur durch Zusatz von mindestens 1 % Triton X-100.

Das Ergebnis dieser Bindungsversuche, starke Bindung an ein schwach hydrophobes Material (Phenyl-Sepharose), fast irreversible Bindung an ein stark hydrophobes Material (Octyl-Sepharose) verdeutlicht, daß die NAD-15HPGDH zu sehr starken hydrophoben Wechselwirkungen in der Lage ist, was bedeutet, daß die Oberfläche der NAD-15HPGDH über relativ große hydrophobe Bereiche verfügt (142,192). Die aus dieser Tatsache möglicherweise resultierenden Wechselwirkungen mit anderen Strukturen sollte man bei keinem Arbeitsgang mit NAD-15HPGDH aus den Augen verlieren, da sonst die Gefahr erheblicher Fehlinterpretationen besteht.

Ein auffälliges Ergebnis dieser Bindungsversuche war, daß sich die NAD-15HPGDH aus Humanplacenta und SN-Medulla gegenüber den hydrophoben Gelen im Rahmen der Versuchsbedingungen gleich verhalten, die NAD-15HPGDH aus SN-Cortex jedoch offensichtlich zu stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen in der Lage ist (siehe Tab. 5). Dies wäre ein erstes Anzeichen dafür, daß sich NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und -Medulla unterscheiden. Das eindeutige Elutionsverhalten der beiden NAD-15HPGDH, das Medullaenzym ließ sich bei 1 mM KP, pH 7,4, 50 % Glycerin, 4°C vollständig von der Phenyl-Sepharose eluieren, das Cortexenzym nur unter Zusatz von 0,1 % Triton

X-100, kann als Kriterium für die Güte der Präparation der beiden Nierenkompartimente herangezogen werden (siehe 3.4.2. und 4.1.3.).

Nach allen anfangs aufgeführten Kriterien handelt es sich bei der Chromatographie von NAD-15HPGDH an Phenyl- wie auch Octyl-Sepharose um eine reine "hydrophobic interaction chromatography", wie Morris (143) sie definiert. Bei der generellen Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen in der Biochemie ist es erstaunlich, wie wenig dieses Verhalten beachtet wird, geschweige denn erfolgreich zur Anreicherung biologischer Makromoleküle eingesetzt wird. Die von Baier (16), Schärfe (184) und Rückrich (178) beschriebenen Anreicherungen von NAD-15HPGDH an Phenyl-Sepharose Cl-6B beweisen, neben den hier vorgelegten Daten, welche großen Möglichkeiten diese Technik bietet.

Die Chromatographie von NAD-15HPGDH aus SN-Cortex sowie SN-Medulla an Blue-Sepharose Cl-6B zeigte den erwarteten Effekt. Bei niederen Ionenstärken (bis ca. 100 mM KP, pH 7,4, 20 % Glycerin) werden beide Enzyme quantitativ an das Gel gebunden. Die Bindung erfolgt wie auch schon für andere nucleotidabhängige Enzyme beschrieben (162) in der sogenannten "nucleotid fold" des kovalent an die Sepharosematrix gebundenen Farbstoffes Cibacron Blue F 3G-A (214). Bindungs- wie auch Elutionsbedingungen waren für beide Enzyme gleichartig. Die Elution konnte entweder unter deformierender Bedingung, im steigenden Salzgradienten (siehe 4.2.3.) oder biospezifisch über 5 mM NAD erfolgen. Abhängig von der Einsatzstelle der Blue-Sepharose Cl-6B innerhalb der Chromatographie-Kette war die Anreicherung, die an diesem Material erzielt werden konnte, bis zu 300-fach. Die Verluste an Enzymaktivität betrugen nie mehr als 25 %. Daß die NAD-15HPGDH aus SN-Cortex wie auch die aus SN-Medulla mit NAD ohne Veränderung der Ionenstärke oder des pH zu eluieren waren, deutet an, daß es sich bei der Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B um eine echte Affinitätschromatographie handelt.

Die mit NAD-Agarose-Gelen durchgeführten Chromatographien hatten nur teilweise Erfolg. An zwei Geltypen, AGNAD^{TM} Typ 3 und AGNAD^{TM} Typ 4, konnte keine, oder eine nur äußerst geringe Bindung (<1 %) der beiden NAD-15HPGDH festgestellt werden. An einem dritten Geltyp, AGNAD^{TM} Typ 1, war die Bindung quantitativ (siehe 4.2.3.). Die Bindung erfolgte bei beiden Enzymen bei niedrigen Ionenstärken (bis 100 mM KP, pH 7,4). Eluiert werden konnten die Enzyme über Salzgradienten oder bei konstanter Salzkonzentration und konstantem pH über 4 mM NAD. An diesem Gel werden bei den geringsten Verlusten an NAD-15HPGDH-Aktivität die besten Anreicherungen erzielt (abhängig vom Einsatz in der Chromatographiekette bis zu 400-fach). Das differenzierte Bindungsverhalten von NAD-15HPGDH gegenüber unterschiedlichen NAD-Agarosen ermöglicht Rückschlüsse auf das NAD-Bindungszentrum der NAD-15HPGDH. Bei AGNAD^{TM} Typ 3 ist das NAD über die C8-Position des Adenins an die Agarose gebunden, bei AGNAD^{TM} Typ 4 über die Hydroxylgruppen der Ribose, bei AGNAD^{TM} typ 1, hergestellt nach Moosbach (141), ist die Bindungsstelle unbekannt. Bei allen drei NAD-Agarose-Typen werden C6-Spacer verwendet. Da bei den ersten beiden Typen keine Bindung der NAD-15HPGDH erfolgte, ist anzunehmen, daß eine Wechselwirkung des derartig gebundenen NAD mit dem entsprechenden Bindungszentrum der NAD-15HPGDH sterisch behindert wird, oder daß die C8-Position des Adenins bzw. Die Hydroxylgruppen der Ribose für die Bindung notwendig sind (135,143,178). Bei AGNAD^{TM} Typ 1 ist offensichtlich genügend viel NAD derart gebunden, daß spezifische Wechselwirkungen mit dem NAD-Bindungszentrum der NAD-15HPGDH nicht gestört werden.

In der Literatur wurden des häufigeren Affinitätschromatographien mit NAD-15HPGDH an deren immobilisierten Substraten beschrieben. Die Erfolge waren jedoch unterschiedlich. Oliw et al. (153) fanden, daß die NAD-15HPGDH aus Schweineniere zwar an $PGF_{1\alpha}$-, $PGF_{2\alpha}$- und $PGF_{2\beta}$Sepharose bindet, jedoch nicht an NAD- oder 5'-AMP-Sepharose. Die Anreicherungen an den PG-Sepharosen waren 100- bis 200-fach. Die Elution der NAD-15HPGDH gelang jedoch weder mit hohen Salzkonzentra-

tionen (0,8 M NaCl) noch mit PGE_2 (ca. 5 mM), sondern nur über ein Absenken des pH auf pH 4, d.h. unter den isoelektrischen Punkt der NAD-15HPGDH (ca. pH 6). Auch Nagasawa et al. (144) berichteten, daß die NAD-15HPGDH aus Rinderlunge zwar an PGE_1-, PGF_1- und PGA_2-Sepharose band, jedoch nicht an NAD-Sepharose. Die von ihnen erzielte Anreicherung war 10-fach für PGE_1- und PGF_1-Sepharose, jedoch nur 6-fach für PGA_2-Sepharose. Auch sie konnten das Enzym nur über ein Absenken des pH auf pH 4 eluieren. Braithwaite & Jarabak (33) hingegen berichten von einer erfolgreichen Chromatographie von NAD-15HPGDH aus Humanplacenta an NAD-Agarose mit anschließender Elution über NADH, geben jedoch keine genauen Angaben bezüglich des Geltyps. Sie erwähnen außerdem, daß es ihnen nicht möglich war, NAD-15HPGDH an PGE_1-, PGE_2- oder $PGF_{2\alpha}$-Gele zu binden (115). Bardsley & Crabbe erzielten an cAMP-Sepharose eine 14-fache Anreicherung des Humanplacentaenzyms (18).

Das von Braithwaite & Jarabak (33) mit dem Humanplacentaenzym erzielte Ergebnis, wie auch die von mir mit NAD-15HPGDH sowohl aus Humanplacenta (184) und hier mit NAD-15HPGDH aus Schweineniere erzielten hohen Anreicherungen an NAD-Agarose widersprechen den obigen Ergebnissen. Es lohnt sich, auf diese Widersprüche näher einzugehen, da die Ergebnisse gerade der Affinitätschromatographien an immobilisierten Substraten häufig dazu verwendet werden, den Mechanismus der enzymatischen Katalyse zu interpretieren. So favorisiert Hansen (86) aufgrund der Ergebnisse der Affinitätschromatographien von Nagasawa et al. (144) und Oliw et al. (231) für die NAD-15HPGDH einen Iso Theorell-Chance Mechanismus mit dem PG als führendem Substrat, wohingegen Rückrich in seinen Arbeiten (178,174,175,176,177) für die NAD-15HPGDH einen Ordered Bi Bi-Mechanismus mit NAD als führendem Substrat beweist.

Die Diskussion der unterschiedlich erfolgreichen Chromatographien von NAD-15HPGDH an NAD-Sepharosen wird dadurch erschwert, daß die anderen Gruppen (144,153,33) keine genauen

Angaben über die Beschaffenheit ihrer NAD-Sepharosen machen. Wie eingangs berichtet, ist jedoch die Art der Bindung des NAD an die Sepharose für die Chromatographie entscheidend. Auch an dieser Stelle ist wieder auf den prinzipiell unterschiedlichen Isolierungsgang der anderen Gruppen hinzuweisen. Im Unterschied zu der von mir angewandten Methode beginnen alle Arbeiten mit einer Ammoniumsulfatfraktionierung. Nagasawa et al. (144) schließen sogar noch eine Acetonfällung an, was in drei NAD-15HPGDH-Banden in ihrer analytischen Disk-Elektrophorese resultiert. Bei Bardsley & Crabbe geht der Ammoniumsulfatfällung eine Chloroform/Ethanol-Fällung voraus, woraus ein verändertes Bindungsverhalten der NAD-15HPGDH resultiert (siehe S.119f). Braithwaite & Jarabak (33) schaffen, wie schon oben erwähnt, nach ihrer Ammoniumsulfatfällung Bedingungen, die dazu in der Lage sind, mögliche Veränderungen der 15HPGDH-Charakteristik durch hydrophobe Wechselwirkungen wieder rückgängig zu machen. Dies könnte ein mögliches Indiz für den Erfolg ihrer Chromatographie an NAD-Sepharose sein. Da jedoch auch hier genaue Angaben über den verwendeten Geltyp fehlen, ist dieser Zusammenhang schwer zu beweisen.

Gegen das Vorliegen reiner Affinitätschromatographien bei den Chromatographien an PG-Sepharosen spricht zunächst, daß die gebundene NAD-15HPGDH nicht biospezifisch, d.h. mit PG, zu eluieren war. Auch die erzielten Anreicherungen sind gegenüber denen, die z.B. an Blue-Sepharose, einem deutlich unspezifischeren Gel, oder NAD-Sepharose des richtigen Typs erzielt werden können, gering. Die Ligandenkonzentration der PG-Sepharosen (ca. 8 µmol/ml Gel) kann nicht limitierend für den Erfolg der Chromatographie gewesen sein, da in keiner Arbeit von NAD-15HPGDH-Aktivität im Durchlauf der Säule berichtet wird. Außerdem waren bei den von mir verwendeten NAD-Agarosen mit einer Ligandenkonzentration von maximal 5 µmol/ml Gel kleinere Gelvolumina in der Lage, wesentlich größere NAD-15HPGDH Mengen zu verkraften. Betrachtet man sich die ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften der NAD-15-HPGDH, die sich über vorangegangene Ammoniumsulfatfällungen

noch verstärken (siehe 4.2.2.), so ist anzunehmen, daß es sich bei den hier beschriebenen Chromatographien an PG-Sepharosen um gemischte hydrophobe Chromatographien handelt. Das Elutionsverhalten der NAD-15HPGDH, weder ist eine Elution bei hohen Salzkonzentrationen (die hydrophobe Wechselwirkungen verstärken würden) möglich, noch mit PG, stützen diese Vermutung. Auch die verwendete hohe Ligandenkonzentration (ca. 8 µmol/ml Gel) ist eher ein Argument für als gegen unspezifische Wechselwirkungen (192,144). Für eine unspezifische Chromatographie spricht auch das Ausbleiben einer Bindung an PGB_2-Sepharose (153), obwohl die PGB bei pH 7,4, als Inhibitoren der NAD-15HPGDH, eine höhere Affinität zum Enzym haben als das Substrat $PGF_{2\alpha}$ (siehe 4.8.3.).

Unter den oben aufgeführten Gesichtspunkten erscheint es als gewagt, die Chromatographien an PG-Sepharosen als ein Indiz für einen, den Mechanismus der enzymatischen Katalyse der NAD-15HPGDH bestimmenden, E·PG-Komplex zu interpretieren (86). Selbst ein Versagen der Affinitätschromatographien an NAD-Sepharosen wäre kein stichhaltiges Argument zur Stützung dieser Interpretation. Die an sich schon geringe in vitro-Affinität von NAD zum Enzym, die K_{iNAD} beträgt ca. 140 µM (siehe Tab. 19), kann durch die Immobilisierung vermindert oder sogar aufgehoben werden, insbesondere wenn zur Bindung an den Träger Gruppen verwendet werden, die für die Wechselwirkung mit dem Enzym wichtig sind (19). Die hier vorgelegten erfolgreichen biospezifischen Chromatographien von NAD-15HPGDH an NAD-Agarose (siehe 4.2.3., 4.2.5.5. und 4.2.6.5.) machen diese Interpretation vollends unglaubwürdig. Wie schon erwähnt, geht auch NAD-15HPGDH aus Humanplacenta mit speziellen NAD-Agarose-Typen biospezifische Wechselwirkungen ein (184,33). In Anbetracht der Unmöglichkeit, NAD-15HPGDH biospezifisch von den PG-Sepharosen zu eluieren, sprechen diese Ergebnisse eher für einen kinetisch signifikanten E·NAD-Komplex.

Der Erfolg der Chromatographie an cAMP-Sepharose (18) ist vollends unklar. Bei pH 7,4 ist cAMP, auch bei höheren Kon-

zentrationen, weder ein Substrat noch ein signifikanter Inhibitor der NAD-15HPGDH (178, siehe auch 4.8.4.). Für eine unspezifische Chromatographie spricht neben der nur geringen Anreicherung (ca. 14-fach) auch das veränderte chromatographische Verhalten der NAD-15HPGDH an DEAE-Sephadex, das auf eine konformative Veränderung des Enzyms zurückzuführen sein dürfte (siehe 4.3.).

Wie auch schon mit NAD-15HPGDH aus Humanplacenta (184) wurden auch mit den Schweinenierenenzymen Chromatographien an Thiopropyl-Sepharose 6B durchgeführt (siehe 4.2.3.). Je nach Einsatz in der Chromatographiekette waren die erzielten Anreicherungen bis zu 100-fach. Dies entsprach auch dem mit dem Humanplacentaenzym erzielten Ergebnis (184). Das Cortex- und Medullaenzym verhielten sich gegenüber diesem Gelmaterial gleichartig. Beide Enzyme ließen sich mit geringen Konzentrationen an Mercaptoethanol quantitativ eluieren.

Der Erfolg dieser kovalenten Chromatographie ist ein deutliches Zeichen dafür, daß die NAD-15HPGDH an ihrer Oberfläche freie SH-Gruppen trägt. Auch für die enzymatische Katalyse der NAD-15HPGDH scheinen eine oder mehrere SH-Gruppen eine entscheidende Rolle zu spielen. Unter Luftsauerstoff eintretende Aktivitätsverluste können durch Zusatz von SH-Schutzreagenzien wie DTE oder ME vermieden werden. Es ist deshalb empfehlenswert, den Isolierungsmedien derartige Reagenzien beizumengen. Wie Rückrich (174) und Thaler-Dao et al. (212) schreiben, kann selbst durch Ellmans Reagenz oder Phenylquecksilberacetat inaktivierte NAD-15HPGDH aus Humanplacenta mit SH-Schutzreagenzien teilweise reaktiviert werden.

Die Abhängigkeit des kinetischen Verhaltens der NAD-15HPGDH von den unterschiedlichen verwendeten Testbedingungen kann nicht deutlicher wiedergegeben werden, als in der in der Arbeit von Hansen (86) dargebotenen tabellarischen Auflistung der von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gefundenen kinetischen Konstanten der NAD-15HPGDH-Reaktion. Die für

NAD-15HPGDH gleicher Spezies- und Gewebeherkunft referierten Werte zeigen größere Differenzen untereinander, als die für unterschiedliche Gewebe gefundenen Werte zueinander. Vergleicht man die Mittelwerte der für die NAD-15HPGDH unterschiedlicher Spezies- und Gewebeherkunft gefundenen kinetischen Konstanten, so entsteht der Eindruck, daß die NAD-15HPGDH bezüglich ihrer Substrataffinitäten Spezies- und Gewebe-unabhängig ist. Diese interessante Beobachtung läßt sich jedoch nur dann stützen oder entkräften, wenn alle Messungen zur kinetischen Charakterisierung der NAD-15HPGDH erstens unter möglichst physiologischen Bedingungen geschehen, soweit das mit isolierten Enzymsystemen überhaupt möglich ist, und zweitens Einflüsse des Testsystems selbst bei der Beurteilung der gefundenen Werte berücksichtigt werden.

Bei der Entwicklung eines für kinetische Messungen geeigneten Testsystems sind generell folgende Punkte zu beachten:

1. Welchen Einfluß haben Art und Konzentration des verwendeten Testpuffers.
2. Welchen Einfluß haben andere Salze.
3. Welchen Einfluß hat der pH des Testsystems.
4. Welchen Einfluß hat die Temperatur des Testsystems.
5. Welchen Einfluß haben Substanzen, die über die Enzym- oder Substratlösungen in das Testsystem gelangen.

Sowohl der Puffer selbst (76,66) wie auch dessen Konzentration (1,2,3) können einen erheblichen Einfluß auf die enzymkinetischen Parameter haben.

In der Literatur werden überwiegend drei Puffersysteme verwendet, TRIS/HCl, KP und TRAP, deren pK-Werte bei 37^{o}C alle in der Nähe von pH 7,4 liegen. Wie Tab. 9 verdeutlicht, zeigen diese drei Puffersubstanzen jedoch abhängig von ihrer Konzentration eine deutlich unterschiedliche Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla. Bis zu Konzentrationen von etwa 50 mM ist der Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit etwa gleich. Bei höheren Konzentrationen hat jedoch TRIS/HCl einen stark aktivierenden und KP einen stark inaktivierenden

Effekt. TRAP zeigt zwar bei hohen Ionenstärken ebenfalls einen aktivierenden Effekt, die prozentuale Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch über den weiten Konzentrationsbereich von 20 - 600 mM vergleichsweise gering. TRAP ist somit als Testsystem für NAD-15HPGDH aus Schweinenieren am geeignetsten. Da Puffer wie auch Salze (s. u.) bei niedrigen Ionenstärken die geringsten Effekte auf die NAD-15HPGDH-Aktivität zeigen, andererseits aber eine ausreichende Pufferkapazität des Systems erwünscht ist, wurde eine Konzentration von 100 mM TRAP gewählt.

Sowohl die Konzentration (Ionenstärke) wie auch die chemische Natur (Anionen- und Kationenzusammensetzung) von Salzen können über die durch sie bewirkte Verstärkung oder Labilisierung ionischer bzw. hydrophober Wechselwirkungen die Konformation eines Proteins und damit seine katalytische Fähigkeit entscheidend beeinflussen (54,102,103).

Fünf verschiedene Ionen wurden in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen bezüglich ihres Einflusses auf die Reaktionsgeschwindigkeit der NAD-15HPGDH untersucht (siehe Tab. 9). Beide Enzyme aus Schweineniere wurden gleichartig beeinflußt. KCl und NaCl zeigen wie TRAP über einen weiten Konzentrationsbereich eine identische nur geringfügige Beeinflussung der Aktivität der NAD-15HPGDH, die bei dem geringen Aussalz- und chaotropen Effekt dieser Salze wohl ausschließlich der Ionenstärke zuzuordnen ist. NH_4Cl führt mit steigender Konzentration zu einer starken Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, wohingegen $(NH_4)_2SO_4$ oberhalb 300 mM stark hemmt. Diese Ergebnisse sind wohl so zu interpretieren, daß K^+, Na^+ und Cl^- keinen speziellen Effekt auf die NAD-15HPGDH-Aktivität haben, wohingegen SO_4^{--}-Ionen stark hemmen und NH_4^+-Ionen stark aktivieren. Vergleicht man TRAP, TRIS/HCl und NH_4^+ miteinander, so fällt auf, daß vom tertiären Amin über das primäre Amin zum Ammoniumion ein zunehmender Aktivierungseffekt zu beobachten ist.

Mit dem pH des Testsystems kann sich sowohl der Dissoziationsgrad des Substrats wie auch die Konformation des Enzymproteins ändern (73). Der mögliche Einfluß beschränkt sich also nicht nur auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die zu ermittelnden kinetischen Konstanten, vielmehr kann der Mechanismus der enzymatischen Katalyse selbst verändert werden (44,197,168,178).

Um in diesem Zusammenhang nur schwer interpretierbare Einflüsse unterschiedlicher Puffersubstanzen zu vermeiden, wurden die pH-Kurven der beiden NAD-15HPGDH über den gesamten pH-Bereich in 100 mM TRAP bei 37°C gemessen. Da der pH direkt im Ansatz kontrolliert wurde, konnte TRAP auch außerhalb seines Pufferbereichs verwendet werden (siehe 4.5.). Beide Schweinenierenenzyme zeigten einen fast identischen Verlauf der pH-Kurven (Abb. 14). Für alle Testläufe wurden die am höchsten angereicherten NAD-15HPGDH-Fraktionen eingesetzt (NAD-Agarose-Pools, siehe 4.2.5.5. bzw. 4.2.6.5.), die keinerlei störende enzymatische Fremdaktivitäten enthielten (siehe 4.8.1.3.).

Der ungewöhnliche Verlauf der pH-Kurven der Schweinenierenenzyme, Anstieg der Kurve zwischen pH 5 bis pH 6,8, Übergang in ein Plateau, das von pH 7 bis ca. pH 8,5 reicht, steiler Anstieg zu einem 2. Maximum (etwa doppelte Höhe des Plateaus) bei ca. pH 9,5 mit anschließendem steilen Abfall, entspricht exakt dem Verlauf der pH-Kurve, die Rückrich (178) unter gleichen Meßbedingungen (100 mM TRAP, 1 mM NAD, 0,05 mM PGE_2, 37°C) für das Humanplacentaenzym erhielt. Dies ist ein bedeutender weiterer Hinweis dafür, wie ähnlich sich NAD-15HPGDH unterschiedlicher Spezies nicht nur bezüglich ihrer spezifischen Affinitäten, sondern auch bezüglich ihres molekularen Aufbaus sind.

Auf eine ausgedehnte Untersuchung der pH-Abhängigkeit, mit dem Ziel, die an der enzymatischen Katalyse beteiligten funktionellen Gruppen zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit verzichtet. Bei der Komplexität der pH-Abhängigkeit des enzymatischen Vorgangs selbst, der nur ungenauen Kenntnis der

pK-Werte funktioneller Aminosäuregruppen in Proteinen (73, 52,7,3,24), schienen weitergehende Untersuchungen, wie die Bestimmung der kinetischen Konstanten bei unterschiedlichen pH-Werten (44) oder die differenzspektroskopische Titration bestimmter Aminosäuren (24), bei erheblichem Arbeitsaufwand einen nur zweifelhaften interpretatorischen Erfolg zu versprechen.

Eine Veränderung des Inkubationsmodus führt zu einem veränderten Kurvenverlauf bei den pH-Extremen. Vorinkubationszeiten über 5 min führen zu einem drastischen Aktivitätsverlust im Bereich um pH 6 und im Bereich des pH-Maximums bei pH 9,5. Im Bereich des Plateaus, pH 7 - pH 8, ist die Vorinkubationszeit nahezu ohne Bedeutung. Inkubationszeiten deutlich unterhalb 5 min führen erstens zu einem steileren Anstieg der pH-Kurve bei niedrigen pH-Werten, damit zu einer Verlängerung des Plateaus zu niedrigen pH-Werten hin und zweitens zu einer Erhöhung des Maximums bei pH 9,5. Dies deutet darauf hin, daß die NAD-15HPGDH in diesen extremen pH-Bereichen zeitabhängig denaturiert wird.

Die pH-Kurve zeigt unabhängig von der Konzentration und der Art des eingesetzten PG einen gleichartigen Verlauf. Ausschlaggebend für den Verlauf der Kurve, besonders Lage und Höhe des 2. Maximums bei pH 9,5, ist jedoch die eingesetzte NAD-Konzentration. Ein Kurvenverlauf wie er in Abb. 14 dargestellt ist, ist nur bei für die Enzyme sättigender NAD-Konzentration (1 mM - 2 mM) zu erwarten. Wird die NAD-Konzentration gesenkt (bis ca. 0,1 mM), so verschiebt sich der Peak zu niedrigeren pH-Werten (ca. pH 9) und verliert deutlich an Höhe. Bei NAD-Konzentrationen unterhalb 0,1 mM NAD nähert sich der Verlauf immer mehr dem einer normalen Glokkenkurve. Dieses Verhalten entspricht dem, was auch über das Humanplacentaenzym berichtet wird (178,136,174,189). Als Erklärung dieses Phänomens bietet sich an, daß dieser Zwischenzustand erhöhter Maximalgeschwindigkeit bei hohen pH-Werten durch NAD stabilisierbar und/oder in seiner Affinität zu beiden Substraten erniedrigt ist, so daß die NAD-

Konzentration gegenüber pH 7,4 einen stärkeren Einfluß auf die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit hat (194).

Für eine auch das aktive Zentrum betreffende konformative Veränderung des Enzymproteins bei hohen pH-Werten spricht auch dessen veränderte Substratspezifität. PGB_1, bei pH 7,4 ein gegenüber PG kompetitiver, gegenüber NAD unkompetitiver Inhibitor der Schweinenierenenzyme (siehe 4.8.3., Abb. 26-29), wird von beiden Enzymen bei pH 9,5 als Substrat angenommen. Ein ähnliches Verhalten fanden Rückrich (178) für das Humanplacentaenzym gegenüber PGB_1, Matschinsky et al. (136) für das Enzym aus Rinderlunge gegenüber PGB_2.

Eine mögliche Erklärung für diese Veränderung des Mechanismus der enzymatischen Katalyse oberhalb pH 8 könnte in der Dissoziation einer oder mehrerer SH-Gruppen liegen. Nach Fromm (73) liegen die pK-Werte von SH-Gruppen in Proteinen zwischen pH 8,3 und pH 8,6. Wie die unter 4.2.3. beschriebenen Versuche gezeigt haben, verfügt die NAD-15HPGDH auch an ihrer Oberfläche, möglicherweise in der Nähe des aktiven Zentrums, über mehrere SH-Gruppen und ist in ihrer Aktivität von deren Intaktheit absolut abhängig (siehe S. 131).

Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurde pH 7,4 gewählt, da sich dieser pH bei den in 100 mM TRAP ermittelten pH-Kurven inmitten eines Plateaus befindet, somit Meßfehler durch pH-Verschiebungen gering gehalten werden können. Überdies kommt dieser pH den physiologischen Gegebenheiten wohl am nächsten. Oberhalb pH 8 sollten keine kinetischen Messungen durchgeführt werden, da diese Messungen aus den oben angeführten Gründen zu schwer interpretierbaren und nicht übertragbaren Ergebnissen führen können. Messungen unterhalb pH 7 sind ebenfalls ungünstig, da in diesem Bereich, abgesehen von einer beginnenden Denaturierung des Enzyms, keine vollständige Dissoziation der Carboxylgruppe der PG gewährleistet ist, was eine Voraussetzung für die volle Entfaltung der katalytischen Aktivität der NAD-15HPGDH zu sein scheint (203,213,172).

Alle biochemischen Strukturen sind in hohem Maße, wenn nicht ausschließlich, von schwachen Bindungen abhängig. Alle Klassen schwacher Bindungen sind jedoch durch Bindungsenergien charakterisiert, die nicht mehr als eine Größenordnung über den im Organismus vorkommenden Wärmeenergien liegen. Mit zunehmender Erhöhung der Temperatur wird deshalb die Tertiär- und Quartärstruktur von z.B. Proteinen kontinuierlich verändert. Über einen weiten Temperaturbereich haben diese Veränderungen häufig zwar eine Änderung, jedoch noch keinen Verlust der katalytischen Kapazität zur Folge. Eine irreversible thermische Denaturierung beginnt bei den meisten Enzymen erst zwischen 40°C bis 50°C.

Diese grundsätzliche Erfahrung wurde auch durch das Verhalten der beiden NAD-15HPGDH aus Schweineniere verdeutlicht. Die Arrhenius-Diagramme beider Enzyme waren für den Bereich zwischen 20°C und 40°C linear (Abb. 15). Erst deutlich oberhalb 40°C ließ die enzymatische Aktivität der NAD-15HPGDH langsam nach, was auf eine beginnende thermische Denaturierung schließen läßt. Bei 40°C waren die Enzyme jedoch auch bei Inkubationszeiten über 20 min absolut stabil. Dieses Verhalten läßt darauf schließen, daß zumindest für den Temperaturbereich von 20 - 40°C keine Konformationsänderungen auftreten, die den Mechanismus der enzymatischen Katalyse entscheidend verändern (54,194,103). Ein gleichartiges Verhalten zeigt auch NAD-15HPGDH aus Humanplacenta. So sind die von Rückrich (178) bei pH 7,4 und 37°C gefundenen kinetischen Konstanten nicht signifikant verschieden von denen, die Schlegel & Greep (188) bei pH 7 - pH 8 und 25°C fanden.

Aus Abb. 15 errechnet sich nach 3.4.11. für die Substrate NAD und PGE_2 für die NAD-15HPGDH aus SN-Cortex eine Aktivierungsenergie von 57,26 kJ/Mol (13,68 kcal/Mol), für das Enzym aus SN-Medulla eine Aktivierungsenergie von 56,69 kJ/Mol (13,54 kcal/Mol). Diese beiden Werte sind im Rahmen der Bestimmungsgenauigkeit nicht signifikant unterschiedlich. Bemerkenswert ist, daß diese Werte mit dem Wert übereinstimmen (13,6 kcal/Mol), den Rückrich (178) unter gleichen Meß-

bedingungen für das Humanplacentaenzym gefunden hat. Der von Braithwaite & Jarabak (33) für das Humanplacentaenzym in 100 mM TRIS/HCl bei pH 9 gefundene Wert von 9,9 kcal/Mol für NAD und PGE_1 unterstreicht unter dieser Sicht nur wieder den Einfluß der unterschiedlichen Meßbedingungen.

Zur Durchführung der kinetischen Messungen wurde eine Temperatur von 37°C gewählt, da diese Temperatur den physiologischen Bedingungen am nächsten kommt, was Einfluß auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die in vivo Verhältnisse haben kann. Ein weiterer Vorteil gegenüber Messungen bei niedrigeren Temperaturen ist die bei 37°C gesteigerte Enzymaktivität. Die aufwendig isolierten Enzympools konnten besser ausgeneutzt werden. Außerdem konnte durch den Einsatz geringerer Enzymmengen vermieden werden, daß Substanzen, die zur Stabilisierung der Enzympools notwendig sind (Glycerin, ME, etc.), die die kinetischen Messungen jedoch stören (siehe unten), in größeren Mengen in den Testansatz gelangen. Eine geringere Meßgenauigkeit gegenüber enzymatischen Messungen bei 25°C, wie sie von Bergmeyer (22) postuliert wird, konnte für die beiden NAD-15HPGDH aus Schweineniere nicht bestätigt werden.

Für alle in den Abschnitten 4.8. und 4.9. dargestellten kinetischen Untersuchungen wurden ausschließlich die am höchsten angereicherten NAD-15HPGDH-Pools (NAD-Agarose-Pool C bzw. M, siehe 4.2.5.5. und 4.2.6.5.) verwendet. Soweit dies mit spektroskopischen Methoden oder radioaktiven Inkubationsansätzen mit anschließender dünnschichtchromatographischer Trennung der Reaktionsprodukte (siehe 4.8.1.2. und 4.8.1.3.) zu beurteilen war, waren die eingesetzten Enzympools frei von enzymatischen Fremdaktivitäten. Eine Beeinflussung der kinetischen Meßergebnisse von dieser Seite her konnte ausgeschlossen werden.

Wie schon vorher beschrieben (siehe S. 124 ff), neigt NAD-15HPGDH zu ausgeprägten hydrophoben Wechselwirkungen. Rückrich (178) beobachtete bei Inkubationsversuchen von NAD-

15HPGDH aus Humanplacenta mit Lipidgemischen eine erhebliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der NAD-15HPGDH. Eine Beeinflussung der Aktivität hydrophober Proteine durch Lipide, z.B. mitochondriale ATPase, ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, wurde auch schon von anderen Gruppen beschrieben (35,78,79,109,222). Die spezifische Durchführung der unter 3.4.7. und 3.4.8. beschriebenen Anreicherungen läßt, trotz in der Niere reichlich vorkommender Lipide, eine über den Verlauf der Isolierung hinaus stabile derartige Wechselwirkung unwahrscheinlich erscheinen. Während der Isolierungen traten keine Bedingungen auf, die mögliche unerwünschte hydrophobe Wechselwirkungen unkalkulierbar verstärken. Über die Einführung einer hydrophoben Chromatographie wurden vielmehr Bedingungen geschaffen, die in der Lage sind, selbst starke hydrophobe Bindungen zu lösen.

Auf Wechselwirkungen mit den hydrophoben Bereichen der NAD-15HPGDH beruht auch der Effekt von Triton X-100, einem nichtionischen Detergenz, auf die Reaktionsgeschwindigkeit der NAD-15HPGDH. Wie aus Tab. 9 zu ersehen, führten schon 0,01 % Triton X-100 im Test zu einer ca. 40 %igen Aktivierung beider NAD-15HPGDH. 0,1 % Triton X-100 führten sogar zu einer über 70 %igen Aktivierung. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Rückrich (178) für das Humanplacentaenzym vorgelegten Werten überein. Rückrich fand eine halbmaximale Aktivierung der NAD-15HPGDH bei 0,008 % Triton X-100, dem Bereich der kritischen Micellenbildung von Triton X-100 (99, 163). Er schließt daraus, daß eher die Triton-Micellen als die Triton-Monomeren wirksam sind. Diese Interpretation gibt einer hydrophoben Wechselwirkung gegenüber einer spezifischen Wechselwirkung mit den Bindungsstellen des Proteins den Vorrang, zumal die Oberfläche der Triton-Micellen unter den aufgeführten Testbedingungen (siehe 3.4.11.) ungeladen ist (17).

Wie unter 4.2.2. gezeigt, war die hydrophobe Wechselwirkung von NAD-15HPGDH aus SN-Cortex mit Phenyl-Sepharose Cl-4B so stark, daß sie nur mit 0,1 % Triton X-100 gelöst werden

konnte. Schon im Laufe der nachfolgenden Chromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B konnte das Triton X-100 jedoch so weitgehend herausgewaschen werden, daß es über seine hohe Eigenabsorption bei 280 nm nicht mehr nachzuweisen war. Über die anschließenden Chromatographieschritte dürften auch letzte Reste abgetrennt worden sein, so daß eine Beeinflussung der kinetischen Untersuchungen der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex durch Triton X-100 nicht mehr zu befürchten war. Die Übereinstimmung der kinetischen Meßwerte beider Schweinenierenenzyme bestärkt diese Vermutung.

Der stabilisierende Effekt von Glycerin auf die NAD-15HPGDH ist zumindest für das Humanplacentaenzym hinlänglich beschrieben (114,174). Will man nicht schon während der Isolierung größere Verluste an NAD-15HPGDH-Aktivität hinnehmen, so sind höhere Glycerinkonzentrationen in den zur Isolierung verwendeten Puffersystemen absolut notwendig (siehe 4.2.4.). Alle für die kinetischen Messungen verwendeten Enzympools waren deshalb 50 %ig an Glycerin. Es war somit nicht zu vermeiden, daß Glycerin, das die NAD-15HPGDH hemmt, in den Testansatz gelangte.

Rückrich (178) fand in seiner kinetischen Arbeit über das Humanplacentaenzym, daß Glycerin die NAD-15HPGDH gegenüber PG linear unkompetitiv hemmt. Seine Meßreihen umfaßten jedoch nur einen Konzentrationsbereich von 0 - 8 % Glycerin (v/v). Innerhalb der von ihm im kinetischen Test verwendeten Konzentrationen (0 - 2,5 %) konnte er keine Beeinflussung der kinetischen Parameter feststellen. Die Glycerinhemmung war nur geringfügig abhängig von der eingesetzten PG-Konzentration und betrug bei 2,5 % Glycerin i. T. maximal 9 %. Die beiden NAD-15HPGDH aus Schweineniere zeigen gegenüber Glycerin ein gleiches Verhalten (siehe 4.7. und Tab. 9). Sowohl für die Schweinenierenenzyme wie auch für das Humanplacentaenzym zeigten sich jedoch bei Glycerinkonzentrationen oberhalb 8 % (v/v) veränderte kinetische Verhaltensmuster. Wie in dem entsprechenden Dixon-Diagramm (Abb. 16) verdeutlicht, weicht die Glycerinhemmung bei hohen Konzentrationen

zunehmend von der Linearität ab. Die Abweichung ist umso größer, je geringer die eingesetzte PG-Konzentration ist.

Wie vollständig sich das kinetische Verhalten der NAD-15HPGDH unter dem Einfluß hoher Glycerinkonzentrationen verändern kann, wird in den Abb. 17 und 18 verdeutlicht. Unter den üblichen von fast allen Arbeitsgruppen verwendeten allgemeinen Standardtestbedingungen, niedrige Ionenstärke, niedrige Glycerinkonzentration, pH 7 - 8, 20°C - 37°C, zeigt das Enzym alle Merkmale einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik (178,16,174,175,176,188,33; siehe auch 4.8. und 4.9.). Wird jedoch in dem in dieser Arbeit verwendeten, für kinetische Messungen optimierten Testsystem (100 mM TRAP, pH 7,4, bis zu 1 % Glycerin, 37°C) die Glycerinkonzentration auf über 10 % (v/v) erhöht, so zeigt sich in den V/S- und doppelt reziproken Diagrammen (Kurve B in Abb. 17 und 18) ein deutlich verändertes kinetisches Verhalten der NAD-15HPGDH gegenüber der von Glycerin unbeeinflußten Reaktion (Kurve A, Abb. 17 und 18). Bei einer Variation des Puffersystems, des pH oder der Temperatur ändert sich das Bild noch drastischer (Kurve C, Abb. 17 und Abb. 18). Es ist ganz offensichtlich, daß unter Bedingungen wie sie für die Kurve C beschrieben sind (10 mM KP, pH 8, 175 mM Sucrose, 0,7 mM EDTA, 10 mM ME, 16,5 % Glycerin, 37°C) konformative Veränderungen des Enzymproteins auftreten, die für sein kinetisches Verhalten entscheidend sind. Für diese Veränderungen bieten sich folgende Erklärungen an. Die kinetisch wirksame Konformation eines Enzymproteins wird in hohem Maße durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Substanzen wie Ethylenglykol oder Glycerin (173,105) führen mit zunehmender Konzentration über eine Polaritätsänderung des Mediums zu einer Labilisierung bzw. Lösung dieser notwendigen Bindungen. Dieser Effekt wird durch niedrige Salzkonzentrationen, zunehmenden chaotropen Effekt (abhängig von der Ionenzusammensetzung der Salze) Erhöhung des pH und Erniedrigung der Temperatur dramatisch verstärkt.

Wie die "kinetisch-theoretisch interessante" Arbeit von Bardsley & Crabbe (18) über NAD-15HPGDH aus Humanplacenta zeigt, führen kinetische Messungen unter derartigen Bedingungen zwangsläufig zu vollständig unterschiedlichen kinetischen Mechanismen der NAD-15HPGDH-Reaktion. Aus dem Methodenteil ihrer Arbeit läßt sich, obwohl kein Pipettierschema angegeben ist, etwa folgendes Testsystem rekonstruieren: Ihr Ansatz enthielt PG, NAD (Lösungsmittel für die Substrate nicht angegeben, jedoch voraussichtlich Wasser, da sonst Angaben hätten erfolgen müssen) und Enzym, das in 10 mM KP, pH 7,4, 1 mM EDTA, 14 mM ME, 20 % Glycerin, 250 mM Sucrose vorliegt. Dieser Ansatz wurde mit 10 mM KP, pH 8, 1 mM EDTA, 14 mM ME, 20 % Glycerin, 250 mM Sucrose auf 1 ml aufgefüllt. Eine Verdünnung ihres Testpuffers erfolgte also ausschließlich über die wohl relativ geringen Volumina der Substratlösungen. Der Anteil an Auffüllpuffer muß auf jeden Fall erheblich sein, da sonst bei der geringen Pufferkapazität von 10 mM KP kein sicheres Verschieben des pH von pH 7,4 auf pH 8 gewährleistet worden wäre. Die endgültigen Konzentrationen in ihrem Testansatz können also nur geringfügig kleiner sein, als die für ihren Testpuffer angegebenen Konzentrationen. Die kritische Glycerinkonzentration im Test liegt damit deutlich über 10 % (v/v).

KP, EDTA und ME haben in den hier auftretenden Konzentrationen keinen Einfluß auf das kinetische Verhalten der NAD-15HPGDH. Unklar ist, aus welchem Grund Sucrose in das Testsystem aufgenommen wurde. Die Verwendung von Sucrose in Puffersystemen zur Isolierung von NAD-15HPGDH aus Humanplacenta wurde bislang nur von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (118,16,174,184,178). Unser zum Eingang einer Isolierung verwendetes Puffersystem, dieses Puffersystem ist fast identisch mit dem Testpuffer von Bardsley & Crabbe, enthielt 250 mM Sucrose, ausschließlich, um möglichst isotone Bedingungen bei der bei uns einer Isolierung vorangehenden Placentaperfusion zu schaffen. Bei einer Testtemperatur von 20°C, wie sie Bardsley & Crabbe verwenden, führen die hohe Glycerinkonzentration, abgesehen von deren kinetischem Ef-

fekt, zusammen mit der hohen Sucrosekonzentration zu erheblichen Mischungsproblemen. Außerdem ist anzunehmen, daß bei der resultierenden Viskosität des Testansatzes die Diffusion der Substrate beeinträchtigt ist.

Mit dem unter diesen Vorbehalten zu betrachtenden Testsystem fanden Bardsley & Crabbe (18) für die NAD-15HPGDH aus Humanplacenta einen komplexen Mechanismus, der sich deutlich von einem Ordered Bi Bi-Mechanismus unterscheidet, wie er von Rückrich (178) für dieses Enzym bewiesen wurde. Für beide Substrate, NAD und $PGF_{2\alpha}$, zeigen die V/S- und die entsprechenden doppelt reziproken Diagramme komplexe "wavy curves", wie sie unter diesen Bedingungen auch mit NAD-15HPGDH aus Schweineniere zu erhalten sind (siehe Abb. 19). Nach dem Verlauf dieser Kurven zu urteilen, müßte die enzymatische Umsetzung bezüglich beider Substrate mindestens entsprechend einer komplexen 4/4-Funktion verlaufen (18). Die Unsicherheit der Meßpunkte in diesem Testsystem lassen Bardsley & Crabbe jedoch vermuten, daß die Reaktionsgleichungen von noch deutlich höherer Ordnung sein könnten.

Wie unter 3.7. gezeigt (Abb. 19), ist dieser komplexe Kurvenverlauf unter den entsprechenden Testbedingungen auch mit hochreiner NAD-15HPGDH aus SN-Medulla nachzuvollziehen. Das beweist, daß der von Bardsley & Crabbe gefundene von einem Ordered Bi Bi-Mechanismus abweichende komplexe Mechanismus der NAD-15HPGDH hauptsächlich ihrem ungeeigneten Testsystem, insbesondere der hohen Glycerinkonzentration zuzuschreiben ist.

Es kann wohl kaum eindrücklicher als anhand dieses Beispieles dargestellt werden, wie wesentlich es ist, sich vor dem Beginn kinetischer Untersuchungen ein Testsystem zu erarbeiten, das für das betreffende Enzym geeignet ist. Dies bedeutet, daß man sich vergewissert, daß möglichst kein Bestandteil des Testsystems mit dem Enzym im Laufe des Tests unerwünschte Wechselwirkungen eingehen kann.

Unter Berücksichtigung aller oben beschriebener Gesichtspunkte erwies sich das in dieser Arbeit verwendete Testsy-

stem (100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C; siehe 3.1.1.) für kinetische Untersuchungen der NAD-15HPGDH als optimal.

Bislang wurden nur von Tai (208) einige kinetische Daten für die NAD-15HPGDH aus Schweineniere vorgelegt. Die beiden Nierenkompartimente wurden jedoch nicht getrennt aufgearbeitet. In seinem Testsystem fand er für PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ und PGA_2 scheinbare K_M von 2,5, 12,5 bzw. 3,9 µM. Von diesen Werten stimmt jedoch nur der K_M app. für PGE_2 größenordnungsmäßig mit den hier gefundenen Werten überein (siehe Tab. 18). Der Hauptgrund für diese Differenzen ist wohl in den vollständig unterschiedlichen Testsystemen zu suchen. Hier wurde ein optisches Testsystem verwendet (siehe 3.1.) und mit hochreinem Enzym gemessen, Tai (208) hingegen mißt direkt im Homogenat mit einem eigens dafür konstruierten Inkubationssystem mit ^3H-markierten PG. Ein interessanter Aspekt dieser Arbeit ist, daß Tai über sterospezifische ^3H-Markierungen des Dinucleotids beweisen konnte, daß die von ihm isolierte NAD-15HPGDH aus Schweineniere bezüglich des Hydrogentransfers am NAD zu den Dehydrogenasen mit "B-Side"-Spezifität gehört.

Die Auswertung der Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Hinreaktion und Rückreaktion der beiden NAD-15HPGDH aus Schweineniere erfolgte wie unter 3.4.14. beschrieben. Die Diskussion des unter diesen Bedingungen vorliegenden enzymatischen Mechanismus erfolgt analog der theoretischen Überlegungen von Cleland (44). Unter Vernachlässigung des in der Reaktionsgleichung auftretenden Protons, wird von einer Bisubstratreaktion in beiden Richtungen ausgegangen.

Im Rahmen des Meßfehlers waren unter den gewählten Versuchsbedingungen (siehe 3.4.14.) alle Primärdiagramme der Substrat-Kreuzserien im Bereich der verwendeten Substrat-Konzentrationen linear. Die Diagramme zeigen eindeutig, daß die NAD-15HPGDH aus Schweineniere einem normalen Michaelis-Menten-Verhalten folgt. Wie die Ergebnisse anderer Autoren (178,16,149,136,114,212,175,189) bestätigen, scheint dieses

Verhalten für die NAD-15HPGDH generell typisch zu sein. Nur Bardley & Crabbe (18) fanden für die NAD-15HPGDH aus Humanplacenta ein von einer Michaelis-Menten-Kinetik abweichendes Verhalten. Wie oben (S. 142 ff) gezeigt werden konnte, ist dieses Ergebnis jedoch auf ihr ungeeignetes Testsystem zurückzuführen.

Für die Meßreihen aller Nucleotid/PG-Kreuzserien zeigen die Lineweaver-Burk Primärdiagramme Schnittpunkte im 2. Quadranten. Aufgrund dieser deutlichen Konvergenz der Meßreihen scheidet ein Ping-Pong-Mechanismus, der im doppelt reziproken Primärdiagramm Parallelen zeigen müßte (73), zur Erklärung der enzymatischen Katalyse der NAD-15HPGDH aus Schweineniere definitiv aus. Nach Cleland (44) ist die Konvergenz der Meßreihen ein deutliches Zeichen für einen sequenzeillen Mechanismus. Alle im Verlauf dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse deuten auf einen Ordered Bi Bi-Mechanismus für die NAD-15HPGDH aus Schweineniere, was im folgenden kurz bewiesen werden soll.

Für den für die Steady-State-Untersuchungen der Hinreaktion und Rückreaktion verwendeten Konzentrationsbereich der Substrate (Abb. 20 und 21 bzw. Abb. 23 und 24) scheidet ein Random-Mechanismus, wie ihn Thaler-Dao et al. (213) für das Humanplacentaenzym vorschlagen, aus. In den doppelt reziproken Diagrammen zeigten alle Meßreihen Schnittpunkte oberhalb der Abszisse, was für $K_A < K_{iA}$ bzw. $K_B < K_{iB}$ gilt. Außerdem lassen sich die in Tab. 15 zusammengefaßten Produktinhibitionsmuster nicht mit einem Random-Mechanismus vereinbaren (41,170).

Ein Theorell-Chance-Mechanismus, wie ihn Braithwaite & Jarabak (32) für das Humanplacentaenzym vorschlugen, ist mit der nicht-kompetitiven Hemmung der 15KPG gegenüber den entsprechenden PG (siehe 4.8.5.; Abb. 39 und 41) nicht in Einklang zu bringen (178). Gegen diesen Mechanismus spricht außerdem, daß sowohl die von Rückrich (178) und Baier (16) für das Humanplacentaenzym, wie auch die hier vorgelegten Lineweaver-Burk Primärdiagramme der Hinreaktion (Abb. 20, 21 und 23, 24)

und Rückreaktion (Abb. 43-46) Schnittpunkte im 2. Quadranten aufweisen. Liegt bei einem Theorell-Chance-Mechanismus der Schnittpunkt im Primärdiagramm der Hinreaktion oberhalb der Abszisse, so muß nach Fromm (73) derjenige im Primärdiagramm der Rückreaktion unterhalb der Abszisse liegen. Nach den gleichen Überlegungen scheidet auch ein Di-Iso Theorell-Chance-Mechanismus für die NAD-15HPGDH aus. Ausgeschlossen ist auch ein Mono-Iso Ordered Bi Bi-Mechanismus (73,41), da er mit der kompetitiven Produkthemmung von NADH gegenüber NAD (Abb. 34 und 37) nicht zu vereinbaren ist.

Hauptsächlich aufgrund einiger Publikationen über erfolgreiche Chromatographien von NAD-15HPGDH unterschiedlicher Gewebe an PG-Sepharosen (144,153) und den erfolglosen Versuchen, NAD-15HPGDH an NAD-Gele zu binden (144,153,175), schlägt Hansen (86) für die NAD-15HPGDH einen Iso Theorell-Chance-Mechanismus vor, bei dem im Gegensatz zum Ordered Bi Bi-Mechanismus PG das führende Substrat ist. Ein Iso Theorell-Chance-Mechanismus würde zwar mit den Produktinhibitionsmustern der NAD-15HPGDH aus Schweineniere (siehe Tab. 16) übereinstimmen, ist jedoch aus folgenden Gründen abzulehnen:

(1) Wie schon weiter vorne (S. 127 ff) ausführlich besprochen, sind die Chromatographien an PG-Sepharosen (144,153) nicht mit Sicherheit als reine Affinitätschromatographien anzusehen, und damit als Beweis für einen kinetisch signifikanten E·PG-Komplex unbrauchbar. Ebenso kann das mögliche Ausbleiben einer Bindung der NAD-15HPGDH an NAD-Sepharosen (144,153,175,178) nicht als Beweis für das Fehlen eines kinetisch signifikanten E·NAD-Komplexes gewertet werden. Die in neuerer Zeit vorgelegten erfolgreichen Affinitätschromatographien an NAD-Agarose, mit anschließender biospezifischer Elution des Enzyms (33,184) (siehe auch 4.2.3.), lassen hingegen eher das Gegenteil vermuten.

(2) Das in Abb. 26 - 29 dargestellte Inhibitionsmuster der PGB-Hemmung ist typisch für einen gegenüber dem zweiten Substrat kompetitiven "dead end"-Inhibitor in einem Ordered Bi Bi-Mechanismus mit NAD als führendem Substrat. Unter den

hier verwendeten Testbedingungen (100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C) hemmt PGB_1 linear kompetitiv gegenüber PGE_2 und linear unkompetitiv gegenüber NAD. Das gleiche Ergebnis erhielt Rückrich (178) unter identischen Testbedingungen für das Humanplacentaenzym. Demgegenüber berichten Nakano et al. (145) für NAD-15HPGDH aus Schweinelunge und Jarabak & Braithwaite (115) für das Humanplacentaenzym von einer nichtkompetitiven Hemmung von PGB_1 gegenüber PGE_1. Dieses leider nicht in Abbildungen dokumentierte Ergebnis ist jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da die Messungen in anderen Testsystemen (pH, Puffer) durchgeführt wurden. Bei hohen pH-Werten kann beispielsweise das aktive Zentrum der NAD-15HPGDH so stark verändert werden, daß Prostaglandine der B-Reihe sogar als Substrat umgesetzt werden (136). Unter Berücksichtigung dieses Vorbehalts spricht das Inhibitionsmuster der PGB_1-Hemmung deutlich für eine Bindung von NAD an das freie Enzym.

(3) Gegen einen Iso Theorell-Chance-Mechanismus spricht weiterhin das Verhalten der NAD-15HPGDH gegenüber seinem alternativen Substrat S-NAD (siehe 4.8.4., Abb. 31-33). Die Konkurrenz von S-NAD gegenüber NAD führt unter den verwendeten Testbedingungen (100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C; Messung am isosbestischen Punkt von S-NAD/S-NADH) zu einer gegenüber NAD kompetitiven Hemmung der NAD-15HPGDH-Reaktion durch S-NAD. Die Hemmung müßte jedoch nicht-kompetitiv gegenüber PG sein, wenn dieses das führende Substrat wäre. Das doppelt reziproke Diagramm (Abb. 33) zeigt jedoch eine nicht lineare Hemmung der NAD-15HPGDH-Reaktion durch S-NAD, die eine Krümmung nahe der Ordinate und eine Assymptote bei hohen Abszissenwerten aufweist. Nach Rudolf & Fromm (170) ist dieses Verhalten ein Indiz dafür, daß zunächst NAD an das freie Enzym bindet. Eine Vereinfachung der von ihnen angegebenen Gleichung für diese Hemmung entspricht einer 2/1-Funktion nach der Definition von Cleland (42). Der offensichtlich einer 2/1-Funktion entsprechende Verlauf der Hemmkurve (Abb. 33) weist dementsprechend deutlich einen kinetisch signifikanten E·NAD-Komplex nach. Damit ist ein sequentieller Mechanismus mit PG als führendem Substrat, d.h. ein Iso Theo-

rell-Chance-Mechanismus, definitiv ausgeschlossen. Zur Erklärung des kinetischen Verhaltens der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla ist somit nur ein Ordered Bi Bi-Mechanismus mit NAD als führendem Substrat geeignet. Alle kinetischen Meßwerte (siehe Tab. 19) lassen sich zwanglos in diesen Mechanismus einfügen.

Unter den hier verwendeten Standardtestbedingungen (3.1.1.) bewirken hohe Konzentrationen der Substrate PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ bei beiden NAD-15HPGDH aus Schweineniere eine Substrataktivierung (Abb. 22 und 25). Dieser Effekt war umso ausgeprägter, je höher die Cosubstrat-Konzentration war. Bei 2 mM NAD ($25 \times K_{NAD}$) führten schon Konzentrationen oberhalb 0,2 mM PGE_2 ($60 \times K_{PG}$) und oberhalb 0,5 mM $PGF_{2\alpha}$ ($10 \times K_{PG}$) zu einer beginnenden Aktivierung der NAD-15HPGDH aus SN-Cortex und SN-Medulla. Bei einer NAD-Konzentration von 0,05 mM (ca. K_{NAD}) setzte die Substrataktivierung erst bei einer Konzentration oberhalb 0,5 mM PGE_2 (ca. $150 \times K_{PG}$) bzw. 1 mM $PGF_{2\alpha}$ ($22 \times K_{PG}$) ein (Abb. 22 und 25). Unter Standardtestbedingungen (3.1.3.) führten 10 mM PGE_2 bzw. $PGF_{2\alpha}$ zu einer 62 %igen bzw. 142 %igen Aktivierung der NAD-15HPGDH. NAD hingegen zeigte auch bei hohen Konzentrationen (ca. $150 \times K_{NAD}$) weder eine Substrataktivierung noch eine Substrathemmung. Die aus den Meßpunkten resultierenden Geraden waren über den weiten Konzentrationsbereich von 0,02 - 10 mM NAD linear (Abb. 30).

Die doppelt reziproken Diagramme der Rückreaktion (Abb. 47) waren bei einer festen $15KPGE_2$-Konzentration (0,1 mM) bis zu Konzentrationen oberhalb von ca. $40 \times K_{NAD}$, bei fester NAD-Konzentration (0,05 mM) bis zu Konzentrationen oberhalb $10 \times K_{15KPG}$ linear. Oberhalb dieser Konzentrationen führten beide Substrate der Rückreaktion zu einer Substrathemmung. Verglichen mit der Anfangsgeschwindigkeit der Rückreaktion bei 0,05 mM NAD und 0,1 mM $15KPGE_2$ unter Standardtestbedingungen (3.1.1.) führten 0,1 mM NADH (ca. $125 \times K_{NADH}$) zu einer 35 %igen, 4 mM $15KPGE_2$ (ca. $125 \times K_{15KPG}$) zu einer 20 %igen Hemmung der Rückreaktion.

Rückrich (178) fand unter gleichen Testbedingungen für die Hinreaktion des Humanplacentaenzyms eine beginnende Substrataktivierung bei PGE_2-Konzentrationen oberhalb 100 x K_{PG} bzw. bei $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen oberhalb 20 x K_{PG}. PGE_1-Konzentrationen oberhalb 20 x K_{PG} zeigten hingegen erstaunlicherweise eine Substrathemmung. Wie Baier (16) zeigen konnte, setzt bei diesem Enzym eine deutliche Hemmung der Rückreaktion erst bei $15KPGE_2$-Konzentrationen oberhalb 30 x K_{15KPG} ein. NADH zeigte erst bei Konzentrationen von ca. 60 x K_{NADH} eine deutliche Hemmung der Rückreaktion.

Diese im Lauf der Zeit in unserer Arbeitsgruppe mit unterschiedlichen Enzymen unter gleichen Testbedingungen (100 mM TRAP, pH 7,4, 37°C) erarbeiteten Werte stehen in deutlichem Widerspruch zu den von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Werten. So fanden Jarabak & Braithwaite (115) sowohl in 100 mM KP, pH 7,0, wie auch in 100 mM TRIS/HCl, pH 9,0 bei 25°C, das PGE_1 wie auch PGE_2, die Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus Humanplacenta bei hohen Konzentrationen hemmen. Sowohl die Hemmung der Hinreaktion, wie auch die von ihnen beschriebene Hemmung der Rückreaktion durch $15KPGE_1$ und $15KPGE_2$ wurde schon bei PG-Konzentrationen signifikant, bei denen in dem in dieser Arbeit verwendeten Testsystem noch kein Effekt zu beobachten war. Jarabak & Braithwaite versuchen, diesen Effekt der PG über die Bildung von E·PG-, E·15KPG-, E·NAD·15KPG- und E·NAD·PG-"dead end"-Komplexe zu erklären. Unter diesem Aspekt gewinnen auch die von Bardsley & Crabbe (18) gemachten Beobachtungen an Bedeutung. In ihrem Testsystem (ca. 10 mM KP, pH 8, hohe Glycerinkonzentration i.T., 20°C) zeigen beide Substrate, $PGF_{2\alpha}$ wie auch NAD, bei hohen Konzentrationen eine Substrathemmung der Hinreaktion der NAD-15HPGDH aus Humanplacenta. Unter für ein Substrat sättigenden Bedingungen tritt jedoch für das jeweilige andere Substrat kein kinetisch signifikanter "dead end"-Komplex auf. Das heißt, die von ihnen gefundene Substrathemmung ist eindeutig nicht "dead end", sondern partial.

Eine eindeutige Interpretation dieser wechselvollen Effekte hoher Substratkonzentrationen ist schwierig. Multiple Enzym-

formen scheiden zur Erklärung aus, da keine der Arbeiten Hinweise dahingehend geben (178,18,16,115). Alle mit den Enzymen durchgeführten Disk-Elektrophoresen sprechen eindeutig dagegen (siehe auch 4.3.). Eine Enzymaggregation scheint ebenfalls unwahrscheinlich, da die V/E_t-Diagramme (hier nicht gezeigt) annähernd linear sind (18). Eine Micellenbildung der PG bei höherer Konzentration mit einem Effekt ähnlich dem von Triton X-100 (siehe 4.7.) ist zwar denkbar, PG sind höhere Fettsäuren, reicht jedoch zur alleinigen Erklärung dieses Phänomens nicht aus. Außerdem müßten sich die Detergenz/PG-Effekte additiv verhalten, was sie jedoch nicht tun (178).

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die NAD-15HPGDH bei hohen PG-Konzentrationen alternativ zum Ordered Bi Bi-Mechanismus einem Random-Mechanismus folgt, der mit zunehmender PG-Konzentration an Bedeutung gewinnt (225,226). Die unter den hier verwendeten Meßbedingungen (siehe 3.1.1.) bei hohen PG-Konzentrationen gemäß einer 2/1-Funktion verlaufenden Meßreihen würden einem derartigen Mechanismus entsprechen (226,161). Mit diesem Mechanismus ist jedoch nicht zu erklären, wieso gleiche PG in einem Testsystem eine Substrataktivierung (178; siehe auch 4.8.2.), in anderen Testsystemen jedoch eine Substrathemmung zeigen (115,18). Die von Bardsley & Crabbe (18) besonders im Bereich hoher Substratkonzentrationen gefundenen "wavy curves" sind durch diesen Mechanismus auch nicht zu erklären. Damit scheidet ein Random-Mechanismus zur alleinigen Erklärung dieses Phänomens wohl auch aus.

Die wohl plausibelste Erklärung böte eine potentielle Wechselwirkung der PG bei höheren Konzentrationen mit einem nahe dem aktiven Zentrum der NAD-15HPGDH gelegenen "effektorischen Zentrum". Bumetanid und Furosemid, zwei Spontandiuretika, hemmen die NAD-15HPGDH sowohl gegenüber NAD wie auch gegenüber PG unkompetitiv (eigenes nicht gezeigtes Ergebnis), d.h. sie zeigen keine direkte Wechselwirkung mit einer der Substratbindungsstellen der NAD-15HPGDH. Dieser

Mediatoreffekt läßt vielmehr darauf schließen, daß in der Nähe des aktiven Zentrums eine Bindungsstelle existiert, die bei Belegung die Konformation des aktiven Zentrums verändert und damit den Reaktionsmechanismus beeinflußt. Tai & Hollander (206,207) fanden an NAD-15HPGDH aus Schweineniere, daß sowohl aktivierende Mediatoren wie Imipramin, Chlorpromazin und davon abgeleitete Pharmaka wie auch hemmende Mediatoren wie Xylocain, Furosemid und Etacrynsäure um diese Bindungsstelle konkurrieren. Unter ihren Testbedingungen (100 mM KP, pH 7,5, 1 mM EDTA, 25°C) fanden sie jedoch keine Anzeichen für eine Kooperativität zwischen dieser "Effektor-Bindungsstelle" und den Substrat-Bindungsstellen.

Bei hohen PG-Konzentrationen kann ein ähnlicher Mechanismus eine Rolle spielen. Es wäre denkbar, daß eben diese oben beschriebene Bindungsstelle oder eine andere Bindungsstelle in der Nähe des aktiven Zentrums unter gewissen Bedingungen von den PG belegt wird, wodurch in der Folge das aktive Zentrum eine konformative Veränderung erfährt. Unklar ist jedoch, wie diese Bindung funktionieren soll. Denkbar wäre, daß die PG, höhere Fettsäuren, bei höheren Konzentrationen zunehmend den Charakter des Mediums bestimmen, in dem das Enzym inkubiert wird. Unter dem Einfluß hoher PG-Konzentrationen könnte so eine fortschreitende Aufweichung der Enzymkonformation in der Nähe des aktiven Zentrums erfolgen, die eine Bindung der PG an eine effektorische Bindungsstelle zunehmend ermöglicht. Ein diesem Mechanismus ähnlicher Lipideffekt ist für andere Enzyme schon beschrieben (35,78,79, 109,222). Mit dieser Vorstellung würde sich auch decken, daß der effektorische Einfluß der PG umso stärker ist, je höher die NAD-Konzentration ist, d.h. je besser die Konformation des aktiven Zentrums an sich stabilisiert ist (Abb. 22 und Abb. 25; siehe auch 4.2.4.).

Über einen derartigen Mechanismus ließe sich auch hinlänglich erklären, wieso unterschiedliche Testbedingungen einen so starken Einfluß auf dieses Phänomen haben. Wie schon wei-

ter oben ausführlich besprochen, haben die Pufferzusammensetzung, der pH, die Temperatur und im Testmedium befindliche andere Substanzen wie z.B. Glycerin einschneidende Auswirkungen auf die Konformation des Enzymproteins. Abhängig von dieser über das jeweilige unterschiedliche Testmedium vorgegebenen Labilisierung oder Veränderung der Konformation könnte nun die Bindung der PG an die Oberfläche des Enzymproteins anders erfolgen und damit einen anderen Effekt auslösen. Der Effekt könnte früher einsetzen, eine Substrathemmung könnte sich in eine Substrataktivierung umkehren. Welchen entscheidenden Einfluß die Zusammensetzung des Testmediums auf das kinetische Verhalten der NAD-15HPGDH haben kann, zeigt auch die Arbeit von Jarabak & Braithwaite (115). In 100 mM KP, pH 7,0, 25°C folgt das Humanplacentaenzym eindeutig einem "ordered ternary complex"-Mechanismus, bei dem zunächst NAD an das freie Enzym bindet. In 100 mM TRIS/HCl, pH 9,0, 25°C verliert der ternäre Komplex jedoch seine kinetische Signifikanz. 15KPGE$_2$, bei pH 7,0 ein gegenüber PGE$_2$ eindeutig nicht-kompetitiver Inhibitor, ist bei pH 9,0 gegenüber PGE$_2$ ein eindeutig kompetitiver Inhibitor. Das kinetische Verhalten der NAD-15HPGDH ähnelt bei pH 9,0 nun eher einem Theorell-Chance-Mechanismus. Ein gutes Beispiel hierfür ist auch wieder die Hemmung der NAD-15HPGDH durch PGB. In dem hier verwendeten Testsystem hemmt PGB$_1$ gegenüber PGE kompetitiv (Abb. 26 und 28; siehe auch Ref. 178). In 100 mM KP, pH 7,0, 25°C hemmt PGB$_1$ gegenüber PGE nicht-kompetitiv (115). Bei pH 9,5 wird PGB$_2$ zum Substrat der NAD-15HPGDH (136).

Auch die eingangs erwähnte konzentrationsabhängige Hemmung der NAD-15HPGDH durch die Diuretika Bumetanid und Furosemid verhält sich entsprechend dieser Theorie. Wird dem Testsystem Glycerin beigemengt (>10 %, v/v), so wird die Konformation des Enzymproteins so stark verändert, daß eine Hemmung durch diese Diuretika auch bei deren Einsatz im mM-Bereich ausbleibt (eigenes unveröffentlichtes Ergebnis). Eine ähnliche Beobachtung machten auch Jarabak & Braithwaite (115) an dem Humanplacentaenzym. In 100 mM KP, pH 7,0, 25°C hemmte

Arachidonsäure, das natürliche Substrat der PG-Synthetase, die NAD-15HPGDH nicht-kompetitiv. Wurde dem Testsystem Glycerin beigemengt, so blieb die Hemmung aus.

Wahrscheinlich ist jedoch nicht nur alleine die aktuelle Enzymkonformation für die Bindung oder die Art der Bindung des Effektors an das Enzymprotein maßgeblich. Auch der Zustand des Effektors selbst (Ladung, Ionisation, etc.) könnte sich abhängig von pH, Temperatur und Polarität des umgebenden Mediums erheblich ändern, was zu sehr komplexen möglicherweise konzentrationsabhängigen Wechselwirkungen mit der aktuellen Konformation der "effektorischen" Bindungsstelle führen kann. In einem Wechselspiel dieser komplexen Vorgänge könnten auch die von Bardley & Crabbe (18) und hier (siehe Abb. 19) bei hohen Glycerinkonzentrationen und 20°C als Anfangsgeschwindigkeitsmuster der NAD-15HPGDH gefundenen "wavy curves" ihre Erklärung finden.

Obwohl von keinem der in vitro-Testsysteme auf in vivo-Bedingungen geschlossen werden kann, gibt doch die mechanistische Labilität der NAD-15HPGDH bei nur geringfügigen Veränderungen ihres Milieus einen Eindruck davon, wie mannigfaltig die Regulationsmöglichkeiten der Zelle bezüglich dieses Enzyms sein können. Daß die NAD-15HPGDH einer strikten zellulären Kontrolle unterliegt, läßt alleine schon ihre äußerst kurze biologische Halbwertszeit vermuten (27). Zusätzlich zu dieser primären Kontrolle über spezifische Proteinbiosyntheseregulationsmechanismen bestehen jedoch, wie hier angedeutet werden konnte, noch zahlreiche andere Regulationsmöglichkeiten. Eine Regulation kann sowohl über direkte Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum erfolgen wie auch über eine effektorische Bindungsstelle. Über diese Bindungsstelle könnte das Enzym sogar einer direkten hormonalen Kontrolle unterliegen. Hinweise auf eine intrazelluläre Regulation der NAD-15HPGDH gibt auch die meist zu Anfang einer Isolierung auftretende Inhibition des Enzyms, die mit zunehmender Reinigung verschwindet. Fast alle Autoren verzeichneten nach der Einführung einer DEAE-Ionenaustauschchromatographie in ihre Isolierungen einen starken Anstieg der NAD-15HPGDH-Ak-

tivität (siehe auch Tab. 7), den sie mit der Abtrennung eines bislang noch nicht identifizierten Inhibitors erklärten. Merkwürdig ist, daß dieser Effekt auch bei den hier durchgeführten Cortexpräparationen regelmäßig auftrat, bei den Medullapräparationen jedoch ausblieb.

Vergleicht man die in dieser Arbeit gefundenen kinetischen Daten für NAD-15HPGDH aus SN-Cortex mit denen des Enzyms aus SN-Medulla (siehe Tab. 19), so ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die Unterschiede in den jeweiligen kinetischen Konstanten sind so gering, daß sie meist nur im Rahmen der möglichen Bestimmungsgenauigkeit schwanken. Dies ist insofern erstaunlich, da über die stark unterschiedliche Hydrophobizität der beiden Enzyme (siehe 4.2.2.) sichergestellt werden konnte, daß es sich in den beiden Kompartimenten der Niere nicht um ein und dasselbe Enzym handelt, sondern daß zwei Enzyme mit offensichtlich unterschiedlichem molekularem Aufbau vorliegen. Dieser Befund ist möglicherweise ein Hinweis auf die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der beiden Enzyme, die entsprechend ihrer individuellen Regulationsaufgaben sein wird.

Anatomisch verteilt sich die PG-Synthese in beiden Kompartimenten der Niere etwa folgendermaßen: Die PGE_2-Synthese findet hauptsächlich in den mesangialen Zellen (199) und den epithelialen Zellen (160) statt, wohingegen die PGI_2-Synthese vermutlich vorwiegend in den Arteriolen stattfindet (211). Insgesamt verfügen die cortikalen tubulären Fragmente über wesentlich geringere Aktivitäten als die Glomeruli (89). Die NAD-15HPGDH ist vorwiegend in den proximalen und distalen Tubuli lokalisiert (148,223,126). Auffällig ist in diesem Zusammenhang, daß die NAD-15HPGDH und der PG-Synthese-Komplex bezüglich ihrer Aktivitäten eine entgegengesetzte Verteilung auf die beiden Nierenkompartimente haben. Cortex und Medulla haben ein NAD-15HPGDH-Verhältnis von etwa 8 : 1 (siehe 4.1.2.; siehe auch Ref. 10,128,126), demgegenüber jedoch ein PG-Synthetase-Verhältnis von mindestens 1 : 10 (126,46,59,11). In Cortex wird hauptsächlich PGE_2,

$PGF_{2\alpha}$ und PGI_2 synthetisiert (231,230,60,211,89,200,70), in Medulla hauptsächlich PGE_2 und PGI_2 (23,30,80,229). Die PGI_2-Synthese korreliert dabei mit der Verteilung der Cyclooxigenase-Aktivität auf die beiden Kompartimente. Interessant ist, daß die PGI_2-Synthese in Cortex offensichtlich fünfmal höher ist als die PGE_2- und $PGF_{2\alpha}$-Synthese (154, 218). Über die Bedeutung des PGI_2 in der Niere ist bislang jedoch nichts Definitives bekannt. PGI_2 relaxiert die Gefäßmuskulatur und hemmt durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels die Thrombozytenaggregation (37,77,138,139,210). Möglicherweise ist seine Wirkung ausschließlich auf das Gefäßsystem der Niere beschränkt.

Unbekannt ist auch der Zielort der PG in der Niere. Interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch eine mit einer Hemmung der NAD-15HPGDH einhergehende Membranpermeabilitätsänderung im Bereich der Tubuli nach Verabreichung von Diuretika wie Bumetanid und Furosemid. Ein Zusammenhang zwischen der durch diese Pharmaka eingeleiteten Diurese und der Wirkung intrazellulärer PG ist zwar ausgiebig und mit meist sehr widersprüchlichen Ergebnissen diskutiert worden (20, 61,155,100,71,215,83,131,185), konnte jedoch noch nicht definitiv nachgewiesen werden.

Allgemein gilt die NAD-15HPGDH als cytoplasmatisches Enzym (86,189). Betrachtet man die zur Isolierung notwendigen Bedingungen, so kann dieser Befund auch für die hier isolierten Schweinenierenenzyme generell bestätigt werden. Zu keinem Zeitpunkt waren Isolierungsbedingungen notwendig, wie sie beispielsweise zur Solubilisierung membrangebundener Enzyme, z.B. dem PG-Synthetase-Komplex, erforderlich sind. Andererseits war die Isolierung der Enzyme umso erfolgreicher, je eindeutiger während der Gewebehomogenisation Bedingungen gewählt wurden, die hydrophobe Wechselwirkungen verringern (niedrige Ionenstärke, Zusatz von Glycerin, Erhöhung des pH, Erniedrigung der Temperatur). Ein unter derartigen Bedingungen erzielter Aktivitätsgewinn konnte über die gesamte nachfolgende Isolierung beibehalten werden. Bei

der Unterschiedlichkeit der hier verwendeten chromatographischen Bedingungen und der damit einhergehenden Unterschiedlichkeit des Medieneinflusses ist dieser prozentual gleichbleibende Aktivitätsgewinn nur schwer über einen die NAD-15HPGDH-Aktivität beeinflussenden effektorischen Mechanismus zu erklären. Es scheint vielmehr so, daß die NAD-15HPGDH unter für sie sehr hydrophilen Bedingungen nicht quantitativ zu isolieren ist. Eine einleuchtende Erklärung hierfür könnte die starke Hydrophobizität der Enzyme geben (siehe 4.2.2.). Die NAD-15HPGDH könnte teilweise über hydrophobe Wechselwirkungen mit Zellstrukturen assoziieren, die während der 140 000 x g - Zentrifugation präzipitieren und sich somit der weiteren Anreicherung entziehen. Für diese Vermutung spricht auch, daß aus dem 140 000 x g - Präzipitat der Cortexpräparationen nur unter Zusatz von Detergenz (Triton X-100) NAD-15HPGDH-Aktivität nachzuextrahieren war. Unter Berücksichtigung des positiv effektorischen Effekts von Triton X-100 auf die Aktivität der NAD-15HPGDH (siehe 4.7. und Ref. 178) betrug der Aktivitätsgewinn ca. 5 % der Gesamtaktivität. Bei der Medullanachextraktion hatte der Detergenzzusatz hingegen kaum Auswirkungen, was sich möglicherweise über die geringere Hydrophobizität des Medullaenzyms erklären ließe (siehe 4.2.2.). Vollkommen unklar ist leider, ob diese offensichtlich hydrophoben Wechselwirkungen der NAD-15HPGDH aus Cortex mit anderen unbekannten Zellstrukturen erst unter den Bedingungen der Gewebehomogenisation auftreten, oder ob das Cortexenzym auch schon in vivo zu derartigen Wechselwirkungen in der Lage ist. Eine Zelldesintegration, wie sie bei Homogenisierungsvorgängen auftritt, schafft natürlich Bedingungen, die zu einer Vielzahl unkalkulierbarer und für den in vivo-Zustand bedeutungsloser Wechselwirkungen führen können. Dies gilt besonders, wenn man als Bezugssystem ein Enzym betrachtet, das, wie weiter vorne verdeutlicht, in seiner Konformation und seinem Reaktionsmechanismus so offensichtlich von seiner jeweiligen Umgebung abhängig ist wie die NAD-15HPGDH.

Der Gedanke einer möglicherweise auch nur zeitweiligen lokkeren Membranassoziation der NAD-15HPGDH auch unter in vivo-Bedingungen, bekanntlich spielen hydrophobe Wechselwirkungen bei Assoziationsvorgängen zwischen Enzymen und Membranstrukturen eine entscheidende Rolle (116,82,34), wäre jedoch faszinierend. Eine möglicherweise damit hergestellte räumliche Nähe zum membrangebundenen PG-Synthese-Komplex (23) erschiene durchaus sinnvoll (8) und gäbe neue Denkanstöße für ein Verständnis der intrazellulären PG-Regulation. Gerade da die NAD-15HPGDH in ihrer Konformation und in ihrem Reaktionsmechanismus so stark von dem sie umgebenden Milieu abhängig ist, wäre denkbar, daß sie unter gewissen Stoffwechselsituationen der Zelle oder unter dem Einfluß von Effektoren zu derartigen Wechselwirkungen befähigt wird. Eine Assoziation des Enzyms, möglicherweise in räumlicher Nähe des PG-Synthese-Komplexes, könnte, folgt man diesem Gedanken, zeitweilig und reversibel unter dem Einfluß regulatorischer Erfordernisse erfolgen. Da über den Wirkungsmechanismus der endogenen PG in der Niere nur sehr widersprüchliches berichtet wird (61), über die regulatorische Funktion der NAD-15HPGDH jedoch gar nichts bekannt ist, bleiben Gedanken dieser Art jedoch, besonders unter Berücksichtigung der oben erwähnten Vorbehalte, zunächst nur reine Spekulation.

Eingedenk dieser Vielzahl von Unwägbarkeiten, besonders der Beeinflußbarkeit der NAD-15HPGDH-Reaktion durch Milieu und effektorische Vorgänge, ist äußerst schwierig abzuschätzen, inwieweit die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse auch unter in vivo-Bedingungen Bedeutung haben. Die hier, wie auch von anderen Arbeitsgruppen, für NAD-15HPGDH gefundenen Michaelis-Konstanten der natürlichen PG (K_{PGE} = 1 - 20 µM; K_{PGF} = 14 - 60 µM; siehe Tab. 19 und Ref. 86) sind gegenüber den äußerst niedrigen endogenen PG-Konzentrationen in Geweben und Körperflüssigkeiten (10^{-11} M - 10^{-7} M; siehe Ref. 8, 56,57,221) sehr hoch. Unter der Annahme, daß diese Konstanten auch unter in vivo-Bedingungen Gültigkeit haben, würde die NAD-15HPGDH in der Zelle im quasi-linearen Bereich der

Michaelis-Menten-Kurve mit Reaktionsgeschwindigkeiten arbeiten, die um Zehnerpotenzen unter den für die PG extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten liegen. Entsprechend einem dynamischen Steady State (44) wären PG-Konzentration und Reaktionsgeschwindigkeit auch dann noch einander proportional, falls die Enzymkonzentration nicht mehr klein gegenüber der Substratkonzentration sein sollte.

Eine Rückreaktion der NAD-15HPGDH ist, wie die in Tab. 19 dargestellten kinetischen Konstanten zeigen, nur dann möglich, wenn so hohe 15KPG-Konzentrationen auftreten, daß die Produkthemmung der Rückreaktion durch endogene PG, die eine wesentlich höhere Affinität zum Enzym haben als die 15KPG (Tab. 19), überwunden wird. Obwohl die Rückreaktion von der Seite der Dinucleotide her bevorzugt wäre (Tab. 19), ist eine physiologische Bedeutung dieser Reaktion kaum denkbar, da die notwendigen 15KPG-Konzentrationen in Geweben nicht zu erwarten sind (86).

Aufgrund der Ergebnisse der doch häufig sehr mangelhaften NAD-15HPGDH-Anreicherungen anderer Arbeitsgruppen (86) mußte bislang davon ausgegangen werden, daß NAD-15HPGDH besonders in Organen mit hoher NAD-15HPGDH-Aktivität wie Lunge, Placenta und Niere, gemessen an den dort zu erwartenden PG-Konzentrationen, in großem Überschuß vorliegt. Diesen Organen wurde deshalb mit einiger Berechtigung eine physiologisch bedeutungsvolle Filterfunktion zugedacht, wobei der NAD-15HPGDH eine zentrale Stellung bei der raschen Metabolisierung und Inaktivierung der für den Körper gefährlichen zirkulierenden PG zukam (69,164,108,180,120,114,181,132). Eine Berechnung[+)] der NAD-15HPGDH-Konzentration in Schweinenierencortex und -medulla mit Hilfe der hier erarbeiteten Daten ergibt jedoch ein ganz anderes Bild. Die NAD-15HPGDH-

---

[+)] Die Berechnung der NAD-15HPGDH-Konzentration erfolgte nach der Methode von Segel (191).

Konzentration wäre in Cortex ca. 3×10^{-10} M, in Medulla ca. 2×10^{-10} M. Aufgrund der meist fehlenden Möglichkeit, in sehr hoch angereicherten Enzymfraktionen noch verläßliche Proteinbestimmungen durchzuführen, sind diese Werte eher noch niedriger als höher anzusetzen. Nach diesen Berechnungen liegt die NAD-15HPGDH in der Zelle keineswegs im Überschuß vor, sondern nur in Konzentrationen, die annähernd denen der endogenen PG in der Niere entsprechen (11,26,46, 58,59,126,127,165). Durch eine klare Kompartimentierung des Enzyms könnten zwar lokal höhere Konzentrationen auftreten, dies gilt jedoch ebenso für die PG. Obwohl die Schweineniere eine der höchsten überhaupt bekannten NAD-15HPGDH-Aktivitäten hat (10), erscheint es in Anbetracht der tatsächlichen NAD-15HPGDH-Konzentration in der Niere als unwahrscheinlich, daß dieses Enzym neben seiner Aufgabe bei der intrazellulären PG-Regulation, wie bislang angenommen, noch Kapazitäten für die rasche Metabolisierung der relativ großen Mengen der in der Niere akkumulierenden extrazellulären PG (147) bietet. Die in der Niere bestehenden Enzym-/Substratverhältnisse legen vielmehr die Vermutung nahe, daß die NAD-15HPGDH ausschließlich Anteil an der Regulation des intrazellulären PG-Spiegels hat. Gestützt wird diese Vermutung durch einige neuere Arbeiten (84,204,224), in denen berichtet wird, daß zirkulierende PG und noch teilaktive PG-Metabolite (15-Keto-PG, 13,14-Dihydro-15-Keto-PG) in der Niere in bisher nicht bekanntem Ausmaß über eine β-oxidative Kettenverkürzung metabolisiert und inaktiviert werden. Zu überprüfen wäre, inwieweit diese Verhältnisse auch für andere Organe gelten, in denen der NAD-15HPGDH bislang eine zentrale Rolle in PG-Metabolismus und Inaktivierung zugedacht war (Placenta, Lunge). Die oben dargebotenen Daten der Nierenenzyme legen es jedenfalls nahe, die Bedeutung der NAD-15HPGDH im Rahmen der PG-Regulationsmechanismen neu zu überdenken.

Mit zunehmendem Wissensstand ist es immer schwieriger geworden, die physiologische Rolle der NAD-15HPGDH in der Niere zu verstehen (61). Nur zukünftige ausgedehnte Untersuchungen

über die Regulation der NAD-15HPGDH in der Zelle und das Schicksal der endogenen PG könnten in dieser Frage weiterbringen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Schweinenieren wurden sorgsam in Cortex und Medulla zerlegt und beide Kompartimente getrennt aufgearbeitet. Über eine automatisierbare Chromatographiekette, bestehend aus Chromatographien an DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose, Blue-Sepharose, Sephadex G-100 und NAD-Agarose, wurden die bislang höchsten Anreicherungen einer Typ I 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.141) erzielt. Aus Cortex bzw. Medulla wurde das Enzym 590 000-fach bzw. 490 000-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von ca. 710 000 bzw. 121 000 mU^{+}/mg Protein angereichert (Ausbeute: 16 bzw. 10 %). Analytische Disk-Elektrophoresen in Polyacrylamidgelen zeigten jeweils nur eine scharfe Aktivitätsbande. Aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen der Enzymlösungen waren Proteinbanden nicht mehr nachzuweisen.

Durch Gelfiltration an Sephadex G-100 wurde für das Cortex- bzw. Medullaenzym ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 51 000 bzw. 50 000 ermittelt.

Cortex und Medulla haben ein Aktivitätsverhältnis von ca. 8,3 : 1. Die Enzymkonzentration in den beiden Kompartimenten ist, entsprechend den hier erhaltenen Werten, höchstens 10^{-10} M, d.h. von etwa gleicher Größenordnung wie die in diesen Kompartimenten vorliegenden Prostaglandin-Konzentrationen.

Beide Enzyme zeigen ausgeprägte hydrophobe Eigenschaften. Aufgrund seiner stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen mit Phenyl-Sepharose Cl-6B läßt sich das Cortexenzym klar vom Medullaenzym abtrennen.

Triton X-100, ein nichtionischen Detergenz, führt zu einer signifikanten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit.

+) Eine mU entspricht der Bildung von 1 nmol NADH/min bei 37°C.

Glycerin hemmt die Typ I 15HPGDH bis zu einer Konzentration von ca. 8 % (v/v) gegenüber beiden Substraten linear unkompetitiv. Bei Konzentrationen oberhalb 8 % weicht die Hemmung zunehmend von der Linearität ab. Bei Glycerinkonzentrationen oberhalb 10 % zeigen beide Enzyme ein von einer Michaelis-Menten-Kinetik abweichendes kinetisches Verhalten ("wavy curves" in den V/S- und doppelt reziproken Diagrammen).

Es wurden Affinitätschromatographien mit unterschiedlichen NAD-Gelen versucht. Beide Enzyme wurden nur von einem Gel-Typ (AGNAD^{TM} Type 1) quantitativ gebunden. Die Elution gelang biospezifisch mit NAD, die Anreicherung war über 400-fach. Daraus zu ziehende Rückschlüsse auf das NAD-Bindungszentrum wurden diskutiert.

Beide Enzyme konnten an Thiopropyl-Sepharose 6B über 90-fach angereichert werden, was verdeutlicht, daß die Enzyme an ihrer Oberfläche SH-Gruppen tragen.

Die kinetischen Messungen wurden in 100 mM Triethanolaminpuffer, pH 7,4, einem speziell für diese Enzyme optimierten Testsystem, bei 37^{o}C durchgeführt. Beide Enzyme verhielten sich bezüglich ihrer pH-Abhängigkeit, Temperaturabhängigkeit und kinetischen Charakteristika gleich.

Für beide Enzyme wurden die kinetischen Konstanten für die PG der E-, F-, A- und D-Reihe vieler derer Metaboliten sowie NAD, NADH und S-NAD ermittelt. Die Substrat,Kreuzserien und Produktinhibitionsmuster der Hin- und Rückreaktion zeigen eindeutig, daß beide Enzyme kinetisch entsprechend einem Ordered Bi Bi-Mechanismus mit dem Nucleotid als führendem Substrat reagieren.

Hohe PGE_2- und $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen führen zu dem Phänomen einer Substrataktivierung. Der Effekt ist umso ausgeprägter, je geringer die Cosubstrat-Konzentration ist. Dieses vom obigen Mechanismus abweichende Verhalten wird diskutiert.

PGB_1 erwies sich als ein gegenüber PG kompetitiver "dead-end"-Inhibitor.

NADP, NADPH, AMP, cAMP und cGMP waren keine oder nur schwache Inhibitoren der enzymatischen Reaktion.

Zur Beurteilung der Relevanz der vorgelegten Ergebnisse für das in vivo-Verhalten der Typ I 15HPGDH wurde großes Gewicht auf die absolute Abhängigkeit der Enzymkonformation und des kinetischen Mechanismus von Milieu- und Effektor-Einflüssen gelegt.

7. L I T E R A T U R

1 Alberty, R.A. (1954) J.Amer.Chem.Soc. 76, 2494-2498.

2 Alberty, R.A. & Massey, V. (1954) Biochim.Biophys.Acta 13, 347-353.

3 Alberty, R.A., Massey, V., Frieden, C. & Fuhlbrigge, A.R. (1954) J.Amer.Chem.Soc. 76, 2485-2493.

4 Andersen, N.H. (1969) J.Lipid Res. 10, 316-319.

5 Andersen, N.H., Ramwell, P.W., Leovey, E.M.K. & Johnson, M. (1976) Adv.PG and TX Res. 1, 271-289.

6 Andrews, P. (1964) Biochem.J. 91, 222-233.

7 Andrews, P. (1970) Methods Biochem.Analysis 18, 1-53.

8 Änggård, E. (1971) Ann.N.Y.Acad.Sci. 180, 200-217.

9 Änggård, E. & Samuelsson, B. (1966) Ark.Kemi 25, 293-300.

10 Änggård, E., Larsson, C. & Samuelsson, B. (1971) Acta Physiol.Scand. 81, 396-404.

11 Änggård, E., Bohman, S.-O., Griffin III, J.E., Larsson, C. & Maunsbach, A.B. (1972) Acta Physiol.Scand. 84, 231-246.

12 Armstrong, J.M., Blackwell, G.J., Flower, R.J., McGiff, J.C., Mullane, K.M. & Vane, J.R. (1976) Nature 260, 582-586.

13 Attallah, A.A., Duchesne, M.J. & Lee, J.B. (1975) Life Sci. 16, 1743-1752.

14 Axen, R., Dervin, H., Carlsson, J. (1975) Acta Chem. Scnad. B 29, 471-474.

15 Baginski, E.S., Foa, P.P. & Zak, B. (1970) in Methoden der enzymatischen Analyse 1 (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) S. 468-473, Verlag Chemie, Weinheim.

16 Baier, W. (1977) Biochem.Diplomarbeit, Univ. Tübingen.

17 Bangham, A.D. & Dawson, R.M.C. (1958) Nature 182, 1292-1293.

18 Bardley, W.G. & Crabbe, M.J.C. (1976) Eur.J.Biochem. 68, 611.619.

19 Bende, H. (1974) Chemie in unserer Zeit 8, 17-25.

20 Benet, L.Z. (1979) J.Pharmacokin.Biopharmacoceut. 7(1), 1-29.

21 Bergmeyer, H.U. (1970) Methoden der Enzymatischen Analyse 1, Verlag Chemie, Weinheim.

22 Bergmeyer, H.U. (1973) Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 39-45.

23 Bhat, S.G., Yoshimoti, T., Yamamoto, S., Hayashi, O. (1978) Biochim.Biophys.Acta 529, 398-408.

24 Bisswanger, H. (1979) Theorie und Methoden der Enzymkinetik, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach (Florida), Basel.

25 Bito, L.Z., Baroody, R.A. (1978) Am.J.Physiol. 234, F80-F88.

26 Blackwell, G.J., Flower, R.J. & Vane, J.R. (1975) Biochim.Biophys.Acta 398, 178-190.

27 Blackwell, G.J., Flower, R.J., Vane, J.R. (1975) Brit. J.Pharm. 55, 233-238.

28 Böhme, H.-J., Koppenschläger, G., Schulz, J., et al. (1972) J.Chromatogr. 69, 209-214.

29 Bohman, S.-O. & Larsson, C. (1975) Acta Physiol.Scand. 94, 244-258.

30 Bohman, S. (1977) Prostaglandins 14, 729-744.

31 Boot, J.R., Dawson, W. & Harvey, J. (1976) Adv.PG and TX Res. 2, 958.

32 Braithwaite, S.S., & Jarabak, J. (1974) Endocrinology 94, A-112.

33 Braithwaite, S.S. & Jarabak, J. (1975) J.Biol.Chem. 250, 2315-2318.

34 Braun, P.E. & Radin, N.S. (1969) Biochemistry 8, 4310-4318.

35 Bruni, A., van Dijck, P.W.M. & de Gier, J. (1975) Biochim.Biophys.Acta 406, 315-328.

36 Bundy, G.L. (1975) Tetrahedron Lett. 24, 1957-1960.

37 Bunting, S., Gryglewski, R., Moncada, S. & Vane, J.R. (1976) Prostaglandins 12, 897-913.

38 Bygdeman, M., Gréen, K., Toppozada, M., Wiqvist, M. & Bergström, S. (1974) Life Sci. 14, 521-531.

39 Caton, M.P.L. (1971) Prog.Med.Chem. 8, 317-376.

40 Chang, D.G., Tai, H.H. (1980 Fed.Proc. 39, 1857.

41 Cleland, W.W. (1963) Biochim.Biophys.Acta 67, 104-137.

42 Cleland, W.W. (1963) Biochim.Biophys.Acta 67, 173-187.

43 Cleland, W.W. (1963) Nature 198, 463-465.

44 Cleland, W.W. (1970) in The Enzymes 2, 3. Aufl. (Boyer, P.D., Hrsg.) Academic Press, New York, London, p. 1-65.

45 Coceani, F., Olley, P.M. & Bodach, E. (1976) Adv.PG and TX Res. 1, 417-427.

46 Crowshaw, K., McGiff, J.C. (1973) in: Mechanisms of Hypertension, Sambhi, M.P., Eds., American Elsevier, New York (N.Y.), p. 254-273.

47 Crutchley, D.J. & Piper, P.J. (1975) Brit.J.Pharmac. 54, 397-399.

48 Danon, A., Chang. L.C.T., Sweetman, B.J., Nies, A.S., Oates, J.A. (1975) Biochim.Biophys.Acta 388, 71-83.

49 Dawson, W., Lewis, R.L., McMahon, R.E. & Sweatman, W.J.F. (1974) Nature 250, 331-332.

50 Dickmann, Z. & Spilman, C.H. (1975) Science 190, 997-998.

51 Distler, A., Wolff, H.P. (1979) Klin.Wochenschr. 57, 1037-1045.

52 Dixon, M. (1953) Biochem.J. 55, 161-170.

53 Dixon, M. (1953) Biochem.J. 55, 170-171.

54 Dixon, M. & Webb, E.C. (1967) Enzymes, 2. Aufl., Longmans, London.

55 van Dorp, D.A. (1969) Naturwissenschaften 56, 124-130.

56 Dray, F. & Charbonnel, B. (1974) Prostaglandins 5, 173-174.

57 Dray, F. & Frydman, R. (1976) Am.J.Obstet.Gynaec. 126, 13-19.

58 Dunn, M.J. (1976) J.Clin.Invest. 58, 862-870.

59 Dunn, M.J. (1976) in: Spontaneous Hypertension: Its Pathogenesis and Complications. Proc. Intern. Symp. on the SHR, 2nd, p. 359-367. Natl.Inst.Health Publ.No. 77-1179.

60 Dunn, M.J., Staley, R.S., Harrison, M. (1976) Prostaglandins 12, 37-47.

61 Dunn, M.J., Hood, V.L. (1977) Am.J.Physiol. 233(3), F169-F184.

62 Dunn, M.J., Liard, J.F., Dray, F. (1978) Kidney Intern. 13, 136-143.

63 Eadie, G.S. (1942) J.Biol.Chem. 146, 85-93.

64 Eisenthal, R. & Cornish-Bowden, A. (1974) Biochem.J. 139, 715-720.

65 Ellin, A., Orrenius, O. (1975) Mol.and Cell Biochem. 8, 69-79.

66 Ellis, G. & Goldberg, D.M. (1977) Clin.Chim.Acta 39, 472-474.

67 von Euler, U.S. (1935) Klin.Wochenschrift 14, 1182-1183.

68 von Euler, U.S. & Eliasson, R. (1967) in Medicinal Chemistry 8 (de Stevens, G., Hrsg.) Academic Press, New York, London; p. 1-164.

69 Ferreira, S.H. & Vane, J.R. (1967) Nature 216, 868-873.

70 Folkert, V.W., Schlondorff, D. (1979) Prostaglandins 17, 79-86.

71 Friedman, P.A., Roch-Ramel, F. (1977) The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 203/1, 82-91.

72 Frölich, J.C., Williams, W.M., Sweetman, B.J., Smigel, M., Carr, K., Hollifield, J.W., Fleisher, S., Nies, A.S., Frisk-Holmberg, M. & Oates, J.A. (1976) Adv.PG and TX Res. 1, 65-80.

73 Fromm, H.J. (1975) Initial Rate Enzyme Kinetics in Molecular Biology Biochemistry and Biophysics 22, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

74 Gabriel, O. (1971) Methods Enzymol. 22, 578-604.

75 Garen, G. & Levinthal, C. (1960) Biochim.Biophys.Acta 38, 470-483.

76 Good, N.E. & Izawa, S. (1977) Methods Enzymol. 24B, 53-68.

77 Gorman, R.R., Bunting, S. & Miller, O.V. (1977) Prostaglandins 13, 377-388.

78 Gotterer, G.S. (1967) Biochemistry 6, 2139-2146.

79 Gotterer, G.S. (1967) Biochemistry 6, 2147-2152.

80 Grenier, F.C., Smith, W.L. (1978) Prostaglandins 16, 759-772.

81 Gross, K.B. & Gillis, C.N. (1976) Life Sic. 19, 1653-1662.

82 Hafeti, Y. & Hanstein, W.G. (1969) Proc.Nat.Acad.Sci USA 62, 1129-1136.

83 Halladay, S.C., Carter, D.E., Sipes, I.G. (1978) Drug Metabolism and Disposition 6/1, 45-49.

84 Hamberg, M., Wilson, M. (1973) Advances in Biosciences 9, 39-48

85 Hanes, C.S. (1932) Biochem.J. 26, 1406-1421.

86 Hansen, H.S. (1976) Prostaglandins 12, 647-679.

87 Hansen, H.S. (1979) Biochim.Biophys.Acta 574, 136-145.

88 Hassid, A. & Levine, L. (1977) Prostaglandins 13, 503-516.

89 Hassid, A., Konieczkowski, M., Dunn, M.J. (1979) Proc. Nat.Acad.Sci.USA 76, 1155-1159.

90 Heinzel, W., Vogt, A., Kallee, E., Faller, W. (1965) J.Clin.Med. 66, 334-343.

99 Helenius, A. & Simons, K. (1972) J.Biol.Chem. 247, 3656-3661.

100 Higashio, T., Abe, Y., Yamamoto, K. (1978) The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 207/1, 212-220.

101 Hilvers, A.G., van Dam, K. (1964) Biochim.Biophys. Acta 81, 391.

102 von Hippel, H.P., Schleich, T. (1969) in "Structure and Stability of Biological Macromolecules", Timasheff, S.N., Fasman, G.D., Eds., Marcel Dekker, Inc. New York (N.Y.), p. 417-574.

103 Hochachka, P.W., Somero, G.N. (1980) Strategien biochemischer Anpassung, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

104 Hofstee, B.H.J. (1952) J.Biol.Chem. 199, 357.364.

105 Hofstee, B.H.J. (1973) Biochim.Biophys.Res.Com. 53, 1137-1144.

106 Hong, S.-C.L. & Levine, L. (1976) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 73, 1730-1734.

107 Hong, S.L., Levine, L. (1976) J.Biol.Chem. 251, 5814-5816.

108 Hook, R. & Gillis, C.N. (1975) Prostaglandins 9, 193-201.

109 Houslay, M.D., Warren, G.B., Birdsall, N.J.M. & Metcalfe, J.C. (1975) FEBS Lett. 51, 146-151.

110 Hsueh, W., Needleman, P. (1978) Prostaglandins 16, 661-682.

111 Irish, III, J.M. (1979) Am.J.Physiol. 237, F268-F273.

112 Isakson, P.C., Raz, A., Needleman, P. (1976) Prostaglandins 12, 739-748.

113 Isakson, P.C., Raz, A., Denny, S.E., Wyche, A., Needleman, P. (1977) Prostaglandins 14, 853-869.

114 Jarabak, J. (1972) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 533-544.

115 Jarabak, J. & Braithwaite, S.S. (1976) Arch.Biochem. Biophys. 177, 245-254.

116 Ji, T.H. & Benson, A.A. (1968) Biochim.Biophys.Acta 150, 686-693.

117 Jones, R.L. (1976) Adv.PG and TX Res. 1, 221-230.

118 Jung, A., Schlegel, W., Jackisch, R., Friedrich, E.J., Wendel, A. & Rückrich, M.F. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 356, 787-798.

119 Kalckar, H.M. (1947) J.Biol.Chem. 167, 461-475.

120 Keirse, M.J.N.C. & Turnbull, A.C. (1975) Brit.J.Obstet. Gynaec. 82, 887-893.

121 Kiefer, H.C., Johnson, C.R. & Arora, K.L. (1975) Anal. Biochem. 68, 336-339.

122 Kirton, K.T., Kimball, F.A. & Porteus, S.E. (1976) Adv.PG and TX Res. 2, 621-625.

123 Kloeze, J. (1969) Biochim.Biophys.Acta 187, 285-292.

124 König, R., Stegemann, H., Francksen, H. & Paul, H.L. (1970) Biochim.Biophys.Acta 207, 184-189.

125 Korff, J., Jarabak, J. (1980) Prostaglandins 20(1), 111-125.

126 Larsson, C., Änggård, E. (1973) European J.Pharmacol. 21, 30-36.

127 Larsson, C., Änggård, E. (1976) J.Pharm.Pharmacol. 28, 326,328.

128 Lee, S.-C., Pong, S.-S., Katzen, D., Wu, K.-Y. & Levine, L. (1975) Biochemistry 14, 142-145.

129 Lee, J.B. (1976) Adv. PG and TX Res. 2, 573-585.

130 Lineweaver, H. & Burk, D. (1934) J.Amer.Chem.Soc. 56, 658-666.

131 Lonigro, A.J., Hagemann, M.H., Stephenson, A.H., Merle, C.L. (1978) Prostaglandins 16/2, 265-276.

132 Losert, W. (1975) Arzneim.-Forsch. 25, 135-148.

133 Lowry, O.H., Passonneau, J.P., Schulz, D.W., Rock, M.K. (1961) J.Biol.Chem. 236, 2746.

134 Marrazzi, M.A. & Andersen, N.H. (1974) in The Prostaglandins 2 (Ramwell, P.W., Hrsg.) Plenum Press, New York, London, p. 99-155.

135 Marrazzi, M.A. & Matschinsky, F.M. (1972) Prostaglandins 1, 373-388.

136 Matschinsky, F.M., Shanahan, D. & Ellerman, J. (1974) Anal. Biochem. 60, 188-199.

137 Maurer, H.R. (1971) Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamid Gel Electrophoresis, W. de Gruyter, Berlin, New York.

138 Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. & Vane, J.R. (1976) Nature 263, 663-665.

139 Moncada, S., Higgs, E.A. & Vane, J.R. (1977) Lancet i 18-21.

140 Moore, P.K., Hoult, J.R.S. (1978) Biochim.Biophys.Acta 528, 276-287.

141 Moosbach, K., Guilford, H., Ohlsen, R., Sco-t, M. (1972) Biochem.J. 127, 625.

142 Morris, C.J.O.R. (1976) TIBS 1, N207-N208.

143 Morris, C.J.O.R. (1977) TIBS 2, N16.

144 Nagasawa, M., Chan, J.A. & Sih, C.J. (1974) Prostaglandins 8, 221-230.

145 Nakano, J., Änggård, E. & Samuelsson, B. (1969) Eur.J. Biochem. 11, 386-389.

146 Needleman, P., Wyche, A., Bronson, S.D., Holmberg, S., Morrison, A.R. (1979) J.Biol.Chem. 254, 9772-9777.

147 Nishibori, T., Matsuoka, Y., Matsumoto, T. (1974) Pharmacometrics 8, 797-805.

148 Nissen, H.M., Andersen, H. (1968) Histochemie 14, 189-200.

149 Nomura, T. & Ogata, H. (1976) Biochim.Biophys.Acta 431, 127-131.

150 O'Carra, P. (1974) Biochem.Soc.Trans. 2, 1289-1294.

152 Oien, H.G., Ham, E.A., Zanetti, M.E., Ulm, E.H., Kuehl, F.A. (1976) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73(4), 1107-1111.

153 Oliw, E., Lundén, I. & Änggård, E. (1976) Adv. PG and TX Res. 1, 147-151.

154 Oliw, E., Lunden, I., Sjoquist, B., Änggård, E. (1979) Acta Physiol.Scand. 105, 359-366.

155 Olsen, U.B., Ahnfelt-Rønne, J. (1976) Acta Pharmacol. et Toxicol. 38, 219-228.

156 Pace-Asciak, C. & Miller, D. (1973) Prostaglandins 4(3), 353-362.

157 Pace-Asciak, C. (1975) J.Biol.Chem. 250, 2789-2794.

158 Pace-Asciak, C. (1975) J.Biol.Chem. 250, 2795-2800.

159 Pace-Asciak, C. (1976) Nature 263, 510-512.

160 Petrulies, A.S., Aikawa, M., Dunn, M.J. (1979) Kidney Intern. 16, 858.

161 Pettersson, G. (1972) Biochim.Biophys.Acta 276, 1-11.

162 Pharmacia Fine Chemicals AB (Schweden), Eds., Affinity Chromatography, Prinicples & Methods, p. 74-79.

163 Pinto, J.T. & Frisell, W.R. (1975) Proc.Soc. Exp.Biol. Med. 148, 981-985.

164 Piper, P.J., Vane, J.R. & Wyllie, J.H. (1970) Nature 225, 600-604.

165 Pong, S.-S., Levine, L. (1976) Res.Comm.Chem.Pathol. Pharmacol. 13, 115-123.

166 Powell, W.S., Hammarström, S. & Samuelsson, B. (1975) Eur.J.Biochem. 56, 73-77.

167 van Praag, D., Farber, S.J., Stanley, D. (1980) Fed. Proc. 39, 1877.

168 Renard, M. & Fersht, A.R. (1973) Biochemistry 12, 4713-4718.

169 Rennick, B.R. (1977) Amer.J.Physiol. 233, F133-F137.

170 Reynard, A.M., Hass, L.F., Jacobsen, D.D. & Boyer, P.D. (1961) J.Biol.Chem. 236, 2277-2283.

171 Reynolds, J.A. & Tanford, C. (1970) J.Biol.Chem. 245, 5161-5165.

172 Roseman, T.J., Sims, B. & Stehle, R.G. (1973) Adv. Biosci. 9, 851-852.

173 Rosengren, J., Pahlman, S., Glad, M. & Hjertén, S. (1975) Biochim.Biophys.Acta 412, 51-61.

174 Rückrich, M.F. (1974) Biochem. Diplomarbeit, Univ. Tübingen (BRD)

175 Rückrich, M.F., Wendel, A., Schlegel, W., Jackisch, R. & Jung, A. (1975) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 799-809.

176 Rückrich, M.F., Schlegel, W. & Jung, A. (1976) FEBS Lett. 68, 59-62.

177 Rückrich, M.F., Wendel, A., Schlegel, W., Jackisch, R. & Jung, A. (1976) Adv. PG and TX Res. 1, 153-157.

178 Rückrich, M.F. (1978) Dissertation, Universität Tübingen (BRD)

179 Rudolph, F.B. & Fromm, H.J. (1970) Biochemistry 9, 4660-4665.

180 Ryan, J.W., Niemeyer, R.S. & Ryan, U. (1975) Prostaglandins 10, 101-108.

181 Samuelsson, B., Granström, E., Grèen, K., Hamberg, M. & Hammarström, S. (1975) Ann.Rev.Biochem. 44, 669-695.

182 Samuelsson, B., Borgeat, P., Hammarström, S., Murphy, R.C. (1980) Adv. PG and TX Res. 6, 1-18.

183 Schaffner, W. & Weissmann, C. (1973) Anal.Biochem. 56, 502-514.

184 Schärfe, J. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen (BRD)

185 Scherer, B., Schnermann, J., Sofroniev, M., Weber, P.C. (1978) Prostaglandins 15/2, 255-266.

186 Scherer, B., Friedmann, B., Dumbs, A., Holzmann, K., Weber, P.C. (1980) Klin.Wochenschr. 58, 449-455.

187 Schimerlick, M.J. & Cleland, W.W. (1973) J.Biol.Chem. 248, 8418-8423.

188 Schlegel, W. & Greep, R.O. (1975) Eur.J.Biochem. 56, 245-252.

189 Schlegel, W., Demers, L.M., Holdenbrandt-Stark, H.E., Behrman, H.R. & Greep, R.O. (1974) Prostaglandins 5, 417-433.

190 Segel, I.H. (1975) Enzyme Kinetics, Behavious and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems, Wiley-Interscience Publication, New York, London, Sidney.

191 Segel, I.H. (1976) Biochemical Calculations, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sidney, Toronto.

192 Shaltiel, S. (1974) in Methods Enzymol. 34B, 126-140.

193 Silberbauer, K., Sinzinger, H. (1978) Thromb.Res. 13, 1111-1118.

194 Siliski, J.M. & Colman, R.F. (1974) Biochim.Biophys. Acta 370, 1-25.

195 Smith, W.L., Wilkin, G.P. (1977) Prostaglandins 13, 873-892.

196 Smith, W.L., Bell, T.G. (1978) Am.J.Physiol. 235, F451-F457.

197 Smith, D.E., Brater, D.C., Lin, E.T., Benet, L.Z. (1979) J.Pharmacokin.Biopharmacoceut. 7(3), 265-274.

198 Smith, W.L., Bell, T.G., Needleman, P. (1979) Prostaglandins 18, 269-277.

199 Sraer, J., Foidart, J., Mahieu, P., Ardaillon, R. (1979) Kidney Intern. 16, 349.

200 Sraer, J., Sraer, J.D., Chansel, D., Russo-Marie, F., Kouznetzova, B., ARdaillon, R. (1979) Mol.Cell.Endocrin. 16, 29-37.

201 Stein, A.M., Lee, J.K., Anderson, C.D. & Anderson, B.M. (1963) Biochemistry 2, 1015-1017.

202 Stone, K.J. & Hart, M. (1975) Prostaglandins 10, 273-288.

203 Sun, F.F., Armour, S.B., Bockstanz, V.R. & McGuire, J.C. (1976) Adv. PG and TX Res. 1, 163-169.

204 Svenborg, K., Bygdeman, M. (1972) Eur.J.Biochem. 28, 127-135.

205 Tai, H.H., Tai, C.L., Hollander, C.S. (1974) Biochem. Biophys.Res.Commun.57, 457-462.

206 Tai, H.-H. & Hollander, C.S. (1976) Adv. PG and TX Res. 1, 171-175.

207 Tai, H.-H. & Hollander, C.S. (1976) Biochem.Biophys. Res.Commun. 68, 814-820.

208 Tai, H.-H. (1976) Biochemistry 15(21), 4586-4592.

209 Terragno, N.A., Malik, K.U., Nasjeletti, A., Terragno, D.A., McGiff, J.C. (1976) Adv. PG and TX Res. 2, 561-571.

210 Tateson, J.E., Moncada, S. & Vane, J.R. (1977) Prostaglandins 13, 389-397

211 Terragno, N.A., McGiff, J.C., Terragno, A. (1978) Clin.Res. 26, 545A.

212 Thaler-Dao, H., Saintot, M., Baudin, G., Descomps, B. & Crastes de Paulet, A. (1974) FEBS Lett. 48, 204-208.

213 Thaler-Dao, H., Saintot, M., Baudin, G., Descomps, B. & Crastes de Paulet, A. (1976) Adv. PG and TX Res. 1, 177-182.

214 Thompson, S.T., Cass, K.H., Stellwagen, E. (1975) Proc. Nat.Acad.Sci.USA 72, 669-672.

215 Velasquez, M.T., Wan, S.H., Maronde, R.F. (1978) Clin. Pharmacol.Ther. 24/2, 186-191.

216 Wasserman, M.A. (1975) Prostaglandins 9, 959-973.

217 Weber, P.C., Scherer, B., Siess, W., Held, E., Schnermann, J. (1979) Klin.Wochenschr. 57, 1021-1029.

218 Weber, P.C., Scherer, B., Siess, W., Held, E., Schnerman, J. (1980) Adv. PG and TX Res. 7, 1067-1077.

219 Westbrook, C., Jarabak, J. (1978) Arch.Biochem.Biophys. 185, 429-442.

220 Whorton, A.R., Smigel, M., Oates, J.A., Frölich, J.C. (1978) Biochim.Biophys.Acta 529, 176-180.

221 Willman, E.A. & Collins, W.P. (1976) J.Endocr. 69, 413-419.

222 Wilschut, J.C., Regts, J. & Scherphof, G. (1976) FEBS Lett. 63, 328-332.

223 Wolfrab, F., Feustel, A. (1978) Acta biol.med.germ. 37, 897-899.

224 Wong, P.Y-K., McGiff, J.C., Cagan, L., Malik, K.U., Sun, F.F. (1979) J.Biol.Chem. 254, 12-14.

225 Wratten, C.C. & Cleland, W.W. (1963) Biochemistry 2, 935-941.

226 Wratten, C.C. & Cleland, W.W. (1965) Biochemistry 4, 2442-2451.

227 Wright, J.T., Corder, C.N., Taylor, R. (1976) Biochem. Pharm. 25, 1669-1673.

228 Yankee, E.W., Ayer, D.E., Bundy, G.L., Lincoln, F.H., Miller, W.L. & Youngdale, G.A. (1976) Adv. PG and TX Res. 1, 195-203.

229 Zenser, T.V., Herman, C.A., Davis, B.B. (1980) Am.J. Physiol. 238, E371-E376.

230 Zusman, R.M., Keiser, H.R. (1977) J.Clin.Invest. 60, 215-223.

231 Zusman, R.M., Keiser, H.R. (1977) J.Biol.Chem. 252, 2069-2071.

Erratum

Die in der Literaturliste fehlenden Literaturstellen 91 - 98 und 151 erscheinen in der Arbeit nicht.

LEBENSLAUF

Jürgen Schärfe
geb. am 01.09.1946 in Hamburg-Großflottbek
Eltern: Dr. Ernst Schärfe, Chemiker
Hanne-Liese Schärfe geb. Meiners

1953 - 1955	Grundschule, Hamburg-Moorfleet
1955 - 1957	Volksschule, Ingelheim am Rhein
1957 - 1964	Gymnasium, Ingelheim am Rhein
1964 - 1966	math.nat. Zug des Gymnasiums in Biberach an der Riß, Abitur
1966 - 1968	Zweijährige Verpflichtung zur Bundeswehr, Ausbildung zum Reserveoffizier
1968-1978	Biochemiestudium an der Universität Tübingen; Mündliche Hauptdiplomprüfung 1977 Diplomarbeit, Mai 1977 - 20. März 1978

Die Experimente zur vorliegenden Dissertation "NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase aus Schweinenierencortex und -medulla. Isolierung und kinetische Charakterisierung der beiden Enzyme" wurden von mir, neben anderen Arbeiten zu Synthese und Stoffwechsel der Prostaglandine in unterschiedlichen Geweben, im Rahmen eines Forschungsvertrages der Firma DR. KARL THOMAE GmbH vom März 1978 bis Juli 1981 im Zentralen Isotopenlabor der Universität in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Jung vom Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren:
Anatomie: Möricke; Anorganische Chemie: Rüdorff; Botanik: Metzner; Histologie: Graumann; Mathematik: Schweizer; Mikrobiologie: Zähner, Lemke; Organische Chemie: Bayer, Hagenmaier; Pharmakologie: Remmer, Bühler; Physik: Krüger; Physiologie: Betz; Physikalische Biochemie: Wenk, Wendel; Physikalische Chemie: Mauser; Physiologische Chemie: Weitzel, Mecke, Weser; Radioisotopenkurs: Feine, Kallee; Zoologie: Grell.